

INDUKTION VON SUPPRESSORAKTIVITÄT
IN AUTOLOGEN UND ALLOGENEN GEMISCHTEN
LYMPHOZYTENKULTUREN BEI PATIENTEN
MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS

von
ULRICH GLÖCKEL
aus
BAD MERGENTHEIM



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut und Poliklinik für klinische Immunologie und Rheumatologie

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. Kalden

INDUKTION VON SUPPRESSORAKTIVITÄT IN AUTOLOGEN UND ALLOGENEN GEMISCHTEN LYMPHOZYTENKULTUREN BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

ULRICH GLÖCKEL

aus

BAD MERGENTHEIM

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. J.R. Kalden

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.1983

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	Einführung	Seite	1
2.	Material und Methoden	"	18
2.1.	Testpersonen	"	18
2.2.	Gewinnung der Lymphozyten aus peripherem Blut	"	18
2.3.	Lymphozyten-Transformationstest (LTT)	"	18
2.4.	Gemischte Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture, MLC)	"	19
2.5.	Autologe gemischte Lymphozyten- kultur (autologous mixed lympho- cyte culture, AMLC) und MLC mit non-T-T-Trennung	"	21
2.6.	Sekundäre Tests	"	23
3.	Ergebnisse	"	25
3.1.	primäre AMLR oder MLC/sekundärer LTT (gesunde Kontrollen)	"	25
3.2.	primäre AMLR oder MLC/sekundäre MLC (gesunde Kontrollen)	"	28
3.3.	Vergleich von RA-Patienten und gesunden Kontrollen hinsichtlich der Aktivität von Zellen aus primärer AMLR/MLC in sek. MLC	"	33
3.4.	Überstände aus primärer AMLR oder MLC/sek. MLC und LTT, RA-Patienten und Kontrollen	"	37
4.	Diskussion	"	41
5.	Zusammenfassung	"	52
6.	Literatur	"	53

E I N F Ü H R U N G

Nach heutiger Kenntnis stellt sich das Immunsystem als ein komplexes Netzwerk von Regulationsmechanismen dar. Verschiedene Zelltypen mit definierten Funktionen und von ihnen produzierte Mediatoren bieten dem Organismus die Möglichkeit, in unterschiedlicher Weise auf die Konfrontation mit von ihm als "fremd" erkannten Antigenen zu reagieren. Das harmonische Zusammenspiel dieser Mechanismen entscheidet darüber, ob es einem Agens gelingt, die körperliche Integrität zu durchbrechen und die physiologischen Abläufe im Organismus zu stören. Die Aufgaben des Immunsystems lassen sich demnach mit den Stichworten "Antigen-erkennung" und "Antigenelimination" charakterisieren.

Der rasche Fortschritt auf dem Gebiet der Immunologie in den letzten Jahren führte zur Aufdeckung zahlreicher Details im Ablauf einer Immunreaktion; vieles bleibt jedoch noch hypothetisch. Zu den grundlegenden Erkenntnissen gehört die Unterscheidung der T-(thymusabhängigen) und B-(bursaabhängigen) Lymphozyten. Während die Aufgabe der B-Lymphozyten in der Antikörperproduktion liegt, sind die Funktionen der T-Lymphozyten vielfach. T-Lymphozyten lassen sich in weitere Subpopulationen untergliedern, welchen bestimmte Funktionen zukommen (66): Zytotoxische T-Zellen ("Killerzellen") sind in der Lage, antigentragende

Abkürzungen: AMLR, autologous mixed lymphocyte reaction; MLC, mixed lymphocyte culture; LTT, Lymphozyten-Transformationstest; RA, Rheumatoide Arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; CON A, Concanavalin A; PHA, Phythämagglutinin; PBL, periphere Blutlymphozyten; CPM, counts per minute; SRBC, sheep red blood cells

Zellen durch direkten Kontakt zu zerstören. T-Zellen mit regulatorischer Wirkung können bestimmte Immunphänomene (z.B. Antikörpersynthese) fördern ("T-Helferzelle") oder hemmen ("T-Suppressorzelle"). Diesen Regulatorzellen scheint eine entscheidende Bedeutung zuzukommen, ob eine Immunreaktion zeitlich begrenzt oder perpetuierend abläuft. Defekte dieser Zellen wurden als mögliche Ursache bestimmter Krankheitsbilder diskutiert. Eine beeinträchtigte Funktion des Suppressorzellsystems könnte zu autoaggressiven Reaktionen und den damit verbundenen klinischen Bildern führen. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigen sich daher besonders mit der Funktion von Thymus-Suppressorzellen.

Erste Schlüsse über das Vorhandensein eines suppressiven Immunmechanismus wurden aus dem lange bekannten Phänomen der "antigenic competition" gezogen. Man versteht darunter die Tatsache, daß die Injektion eines Antigens in ein Versuchstier zu einer verminderten Immunantwort gegenüber einem zweiten, später verabreichten Antigen führt. Konkrete Hinweise auf die Existenz von Suppressorzellen ergaben sich 1970 durch Arbeiten von Baker et al., in denen gezeigt wurde, daß Antilymphozytenserum eine Steigerung der Antikörpersynthese bei mit Pneumokokkenpolysaccharid (SSS-III) immunisierten Mäusen bewirkt, was man auf die Inaktivierung einer thymusabhängigen Suppressorzelle zurückführte. Reinfusion von Thymuszellen hob diesen Effekt auf (4,5).

Folgende Untersuchungen ließen schon bald vermuten, daß für stimulatorische und inhibitorische Effekte zwei verschiedene Thymuszellpopulationen verantwortlich sind (1,5,29,30,69,80), wobei weitere Ergebnisse zunächst beim Versuchstier gewonnen wurden:

Es ergab sich, daß die Stimulation zur Blastenformation von Lymphozyten durch pflanzliche Mitogene (CON A, Concanavalin A und PHA, Phythämagglutinin) auch mit der Aktivierung von Regulatorzellen verbunden ist (15,68,71). Dabei zeigte sich, daß eine mitogene Stimulation grundsätzlich Helfer- und Suppressorzellen erfaßt, und daß im Testsystem nur die Balance beider Populationen gemessen werden kann. Welcher Effekt überwiegt, hängt in entscheidendem Maße mit von den Versuchsbedingungen ab.

Rich und Pierce fanden, daß "submitogene" Dosen von CON A zur Induktion von Helferzellen, "optimale mitogene" Dosen zur Induktion von Suppressorzellen führen (68). Weitere Modifikationen ergeben sich durch den Zeitpunkt der Mitogengabe während der Inkubation sowie durch die Anzahl der ins Assaysystem eingesetzten mitogenaktivierten Zellen (16). Als Testsystem wurde bei diesen Versuchen der PFC-(plaque forming cell)assay verwendet, der es ermöglicht, die Antikörpersynthese gegen bestimmte Antigene und deren Beeinflussung durch Regulatorzellen zu erfassen.

1974 beschrieben Folch und Waksman, daß Entfernung adhärenter Zellen aus Stimulator-

oder Responderfraktion einer gemischten Lymphozytenkultur (MLC) bei Ratten zu einer Erhöhung der Proliferationsrate führte (25). Die MLC-Proliferation ließ sich auch durch Zugabe CON A-aktivierter Lymphozyten unterdrücken (71). Mit diesen Experimenten war nicht nur die Existenz von Suppressorzellen für die Antikörperproduktion, sondern auch für T-Zell-Proliferations-Reaktionen gezeigt.

Peavy und Pierce bzw. Kastner und Rich beschrieben die Inhibition zytotoxischer Lymphozyten durch CON A-aktivierte Milzzellen (43,62).

Detaillierte Angaben über CON A-aktivierte Zellen machte Dutton (15): Danach ist der Grad der Suppression von der CON A-Dosis abhängig. Die Möglichkeit, Suppressorzellen zu aktivieren geht rasch verloren; nach vorheriger 24stündiger Kultivierung der Lymphozyten wird durch CON A ein Helfer-Effekt erreicht. Weitere Einflußgrößen sind Zelldichte und die Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum) (13). Aktivierete Suppressorlymphozyten üben ihre Wirkungen zum Teil durch humorale Mediatoren aus. Gershon folgert aus seinen Untersuchungen (30), daß Stimulation oder Inhibition durch einen Rückkoppelungsmechanismus gesteuert werden, der auf hohe oder niedrige Aktivität des Immunsystems reagiert. Durch das spezifische Antigen wird der "Sollwert" beeinflusst. Andere Untersuchungen erbrachten Hinweise, daß keine "autonome" Suppressorzelle existiert, sondern daß es sich wieder

um einen komplexeren Mechanismus handelt, für dessen Zustandekommen das Zusammenspiel mehrerer Zellen notwendig ist (17,30).

Schon bald wurde die Beobachtung der Immunsuppression mit dem Phänomen der immunologischen Toleranz in Verbindung gebracht (6,46,56). Es gelang, Toleranz gegen einige Proteinantigene bei Mäusen durch T-Zellen zu übertragen.

Zell-vermittelte Immunsuppression kann antigenspezifisch sein (1,9,15,16), d.h. nur die Immunantwort gegen das ursprünglich immunisierende Antigen unterdrücken, jedoch treten nach Immunisierung mit definierten Antigenen auch unspezifische Suppressoreffekte auf (6,30).

Nachdem die Aktivierung von Suppressorzellen durch verschiedene Proteinantigene und Mitogene bekannt war, erzeugten Hirano und Nordin Suppressorzellen und zytotoxische Lymphozyten durch Stimulation von Lymphozyten mit allogenen Zellen in der MLC (35). Auch spontanes Auftreten von Suppressorzellen während der Kultivierung von Lymphozyten wurde beobachtet (37,61).

Eardley et al. konnten 1978 Helfer- und Suppressorzellen bei der Maus bestimmten Zelloberflächen-Markern zuordnen (17): Ly 1+2,3- für T-Helfer- und Ly 1-2,3+ für T-Suppressorzellen.

Dem Tierexperiment folgend zeigten sich bald auch beim Menschen ähnliche Resultate. Sampson et al. (79) beschrieben 1975

CON A- und PHA-stimulierte humane Milzzellen mit Suppressoraktivität in einer sekundären MLC. Der Suppressoreffekt war stärker ausgeprägt, wenn die MLC-Responderzellen vom gleichen Spender wie die Suppressorzellen stammten. Durch Inkubation mit CON A erhielten Hubert et al. Suppressorzellen für die Immunantwort gegen Candida-Antigen, CON A und bei Alloantigen-aktivierten Lymphozyten (38). In diesem Testsystem wurden die CON A-aktivierten Zellen mit dem Mitosehemmer Mitomycin C behandelt, um eine Maskierung des Suppressoreffektes durch eine mögliche Eigenproliferation dieser Zellen auszuschließen. Ebenso gingen Shou et al. bei ihrer Studie über CON A-aktivierte Suppressorzellen vor (82). Gelegentlich wurden jedoch auch stimulatorische oder fehlende Effekte gefunden, ohne daß sich hierfür eine Erklärung ergab. Fineman et al. (23) fanden eine Suppression der Proliferation von Lymphozyten durch CON A-aktivierte autologe Zellen und Aufhebung dieses Effektes durch Mitomycin C-Behandlung.

Bean et al. beobachteten, daß Lymphozyten eines Patienten mit Blasenkarzinom Zellen gesunder Personen nicht in der MLC stimulieren konnten (7). Weitere Experimente mit Thymuslymphozyten des Blasenkarzinom-Trägers führten zu dem Schluß, daß zwischen Suppressorzellen und Zellen, deren Funktion supprimiert werden soll ("Targetzellen"), eine Verwandtschaft hinsichtlich bestimmter HLA-Antigene bestehen muß. Ähnliche Forderungen

wurden auch für MHC-Gene bei der Maus aufgestellt (9). Die Frage der genetischen Verwandtschaft wurde jedoch noch nicht eindeutig geklärt; es wurden ebenso Suppressoreffekte zwischen allogenen Zellen beobachtet. Als Erklärung nimmt man die Existenz verschiedener Suppressorzellpopulationen an.

1977 beschrieben Hirschberg und Thorsby die Aktivierung unspezifischer Suppressorzellen in der MLC, welche die Proliferation autologer Responderzellen gegenüber allogenen Stimulatorzellen in einer sekundären MLC hemmten (36). Auch bei der reziproken Stimulator/Responder-Kombination in der sek. MLC zeigte sich der gleiche Effekt. Die Suppressorzellen wurden nicht mit Mitomycin C behandelt. Hinweise auf HLA-Restriktionen fanden McMichael und Sasazuki sowie Engleman et al. bei der Untersuchung von MLC-induzierten Suppressorzellen in Familienstudien (51,18).

Sakane und Green beschrieben CON A-aktivierte Suppressorzellen für proliferative Immunreaktionen auf Mitogene und allogene Zellen und stellten fest, daß eine Blastentransformation offenbar keine Voraussetzung für die Aktivierung von Suppressorzellen darstellt (75).

Eine ausführliche Studie über CON A- und PHA-aktivierte Suppressorzellen veröffentlichten Birnbaum und Swick (10). Sie fanden Inhibition der zytotoxischen Immunantwort, jedoch keinen Einfluß auf die Proliferation.

Die beobachteten Wirkungen waren bei autologen und allogenen Respondern gleichermaßen ausgeprägt. Mitomycinbehandlung führte zum Verlust des Suppressoreffektes. Auch hier war bei einigen Personen kein Suppressoreffekt zu erzielen, obwohl die Stimulation mit CON A eine gute Proliferation bewirkte. Es wurden sogar unterschiedliche Resultate bei gleichen Personen an verschiedenen Tagen beobachtet, ohne daß sich hierfür eine Begründung ergab.

Feighery et al. fanden eine erhöhte Mitogenstimulation bei Zellen, die vor der Mitogengabe für 24 Stunden inkubiert worden waren und führten dies auf den Verlust kurzlebiger Suppressorzellen während dieser Phase zurück (20).

Haynes und Fauci untersuchten die Wirkung von CON A-Suppressorzellen auf B-Lymphozyten. Dabei wurde die PFC-Antwort gegen pokeweed mitogen (PWM) inhibiert, nicht aber die Blastogenese (34).

Ein anderes System verwendeten Sheehy et al. zum Nachweis spezifischer Suppressoreffekte (81): Sie aktivierten Zellen in einer allogenen MLC und testeten ihre Aktivität in einer zweiten MLC mit gleichem Stimulator/Responder-Paar. Bei höheren Prozentsätzen der in die sek. MLC eingesetzten Zellen aus prim. MLCs fanden die Autoren auch unspezifische Effekte, welche sie mit einer zytotoxischen Wirkung auf die Stimulatorzellen erklärten. Bestrahlung führte zur Abschwächung des Effektes. Rinehart fand Suppressorwirkung in einem

vollständig allogenen System mit verschiedenen Personen in Erst- und Zweit-MLC (74). Der Grad der Suppression war korrelierbar zur Proliferationsrate in der prim. MLC. Mitomycinbehandlung bewirkte Aufhebung des Suppressoreffektes. Assaysysteme mit prim. und sek. MLC verwendeten auch Randazzo et al. (63) und Frey et al. (26), letztere bestätigten die Bestrahlungssensibilität der Suppressorzellen.

Rice et al. (67) beschrieben drei verschiedene Suppressorsysteme im menschlichen Blut: ein stabiles monozytenabhängiges, ein prostaglandinabhängiges und ein CON A-induzierbares T-Zell-abhängiges. HLA-Restriktionen ergaben sich nicht.

Die Strahlungssensibilität der Suppressorzellen, die bereits mehrfach beobachtet worden war, wurde von Wasserman et al. eingehend untersucht (96). Es zeigte sich, daß die Antikörperproduktion -gemessen in einem ELISA-Testsystem- bei Anwesenheit bestrahlter (16 Gy) Suppressorlymphozyten höher ist als bei unbestrahlten, was für die Strahlenempfindlichkeit von Suppressorzellen spricht.

Suppression autologer und allogener Lymphozyten-Proliferation stellten Galanaud et al. mit CON A-aktivierten Lymphozyten fest (28). Mitomycinbehandlung beseitigte den Effekt. Mit einem speziellen FCS (fetal calf serum) ließen sich auch spontane Suppressorzellen mit einem starken Effekt auf allogene Zellen erhalten.

Reinherz und Schlossman gelang die Zuordnung bestimmter Marker zu Regulator-

zellen, ähnlich wie dies für die Maus bereits beschrieben worden war: TH2+ für Suppressor-, TH2- für Helferzellen (64). Eine genauere Differenzierung der T-Zellen gelang in neueren Arbeiten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (65,66). Borkowsky und Valentine fanden, daß mit definierten Antigenen sensibilisierte Lymphozyten die Immunantwort frischer autologer Zellen vornehmlich gegen dasselbe Antigen unterdrücken konnten (11). Fuller et al. beobachteten eine starke spezifische und geringere unspezifische Suppression mit MLC-aktivierten Zellen (27).

Neue interessante Möglichkeiten zur Erklärung immunregulatorischer Mechanismen ergaben sich durch die Entdeckung, daß T-Lymphozyten nicht nur durch Lymphozyten eines allogenen Partners stimuliert werden, sondern daß eine T-Zell-Proliferation auch unter Verwendung autologer non-T-Zellen möglich ist. Zum Unterschied zur allogenen MLC wurde diese Reaktion "autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR)" genannt (47,60). Wenn auch in der allogenen MLC für die Stimulation von Thymuslymphozyten non-T-Zellen verantwortlich sind (47,103), scheinen jedoch die Stimulatorpopulationen für autologe und allogene MLCs unterschiedlich zu sein (84). Auch hinsichtlich der T-Responder-Fraktion bestehen offenbar Unterschiede in der autologen und allogenen MLC, wobei ein gewisses Maß an Kreuzreaktivität zu verzeichnen ist (78,98). Weksler

und Kozak zeigten, daß die AMLR immunologisches Gedächtnis und Spezifität beinhaltet, also eine Immunreaktion darstellt (98). Es wurde vermutet, daß autologe und allogene MLC qualitativ verschiedene Immunphänomene darstellen, wobei man der Stimulation von T-Zellen durch autologe non-T-Zellen eine Bedeutung bei der Immunregulation zuschreibt (47). Dies führte zu dem Versuch, ähnlich der allogenen MLC, auch in der AMLR die Aktivierung von Regulator- bzw. Effektorzellen nachzuweisen. Dabei werden autozytotoxische Zellen offenbar nicht in der AMLR erzeugt (53,93). Sakane und Green wiesen darauf hin, daß die AMLR-reaktive T-Zell-Population möglicherweise mehr Suppressorzellen enthält als die allogenen reaktive (78).

Eine interessante Beobachtung machten Smith und Knowlton 1979, als sie in einer AMLR die Aktivierung von Suppressorzellen nachweisen konnten, welche proliferative und zytotoxische Immunreaktionen inhibierten (85). Die Suppressorzellen waren empfindlich gegenüber einer Behandlung mit Mitomycin C. In ihrer Arbeit diskutieren die Autoren die Möglichkeit, daß eine beeinträchtigte non-T-T-Interaktion in der AMLR mit dem daraus resultierenden Suppressorzellverlust eine pathogenetische Bedeutung für lymphoproliferative und Autoimmunkrankheiten haben könnte.

Innes et al. untersuchten AMLR-aktivierte Suppressorzellen mit dem PFC-Assay (39). Durch zusätzliche Gabe von CON A wurde

der Suppressoreffekt verstärkt. Die Bestrahlung der aktivierten Zellen mit 3000 R resultierte in einer Helfer-Aktivität. Wenn in Lymphozytenpräparationen weniger als 2% non-T-Zellen enthalten waren, konnte durch CON A-Stimulation keine Suppressoraktivität mehr induziert werden. Bereits Hodes und Hathcock (37) hatten darauf hingewiesen, daß in reinen T-Zell-Präparationen durch Kultivierung kein Suppressoreffekt zu induzieren ist. Es liegt also der Schluß nahe, daß die Stimulation von T-Zellen durch autologe non-T-Zellen auch bei der mitogeninduzierten Aktivierung von Suppressorzellen eine Rolle spielt, ebenso bei ihrer spontanen Entwicklung.

Nicht lange nach dem Nachweis von Suppressorzellen beim Versuchstier gab es bereits experimentelle Hinweise dafür, daß die Suppressorzellen ihre Wirkung zumindest teilweise über humorale Faktoren ausüben (40). Feldmann beschrieb 1974 einen antigenspezifischen Suppressorfaktor (21), Zembala und Asherson fanden einen Faktor, welcher die Übertragung von Kontakt-Überempfindlichkeit bei der Maus hemmte (102). Okumura und Tada demonstrierten einen Suppressorfaktor in mit *Ascaris suum*-Antigen immunisierten Ratten (59). Rich und Pierce fanden in den Überständen von mit CON A stimulierten Maus-Lymphozyten einen suppressiven Faktor für die PFC-response gegen Fremderthyrozyten (SIRS, soluble immune response suppressor) (70). Ein entsprechendes Ergebnis erhielten Thomas

et al. mit OvA-immunisierten Maus-Lymphozyten (90). Ähnlich wie für den zellulären Bereich wurde bald vermutet, daß für Helfer- und Suppressoreffekte unterschiedliche Mediatoren von den entsprechenden Zellen gebildet werden (15,88).

Rich und Rich beschrieben, daß die inhibitorische Wirkung von mit allogenen Zellen aktivierten Mauszellen auf eine MLC durch ein humorales Produkt dieser Zellen substituierbar ist (72). Tada et al. (89) konnten die Antikörperantwort bei H-2-kompatiblen Mausstämmen durch einen T-Zell-Faktor inhibieren, für MLC-Proliferation gelang dasselbe Rich und Rich (73). Sie vermuteten, daß Suppressorfaktoren nur auf Lymphozyten wirken, welche durch einen antigenen oder mitogenen Reiz aktiviert wurden.

Namba et al. (58) aktivierten Ratten-Lymphozyten mit CON A und fanden in den Kulturüberständen einen Faktor, welcher die PHA-induzierte Lymphozyten-Proliferation hemmte (IDS, inhibitor of DNA synthesis). Mitomycin C-behandelte Zellen produzierten keine Suppressorsubstanz. Neben IDS untersuchten Namba und Waksman (57) noch weitere von Ratten-Lymphozyten produzierte Substanzen mit suppressivem Effekt: Lymphotoxin mit Killeraktivität für Fibroblasten und PIF (proliferation inhibitory factor) mit einer Fibroblasten-Proliferations-hemmenden Eigenschaft.

Bis Mitte der 70er Jahre waren zahlreiche lösliche Faktoren mit hemmender oder fördernder immunregulatorischer Wirkung

bekannt, jeweils charakterisiert durch das Testsystem, in dem sie beschrieben wurden, teilweise auch durch unterschiedliche physikalische Eigenschaften (Übersicht in 94). Die unterschiedlichen Systeme machten es jedoch schwierig, die einzelnen beschriebenen Faktoren zu vergleichen und zu beurteilen.

Badger et al. (3) fanden in Überständen von PHA-stimulierten humanen Lymphozyten einen Faktor mit einem zytostatischen Effekt (PIF). Jeffes und Granger stimulierten humane Lymphozyten mit CON A und PHA, untersuchten in den Überständen PIF, Lymphotoxin und CIF (cloning inhibitory factor) und vermuteten, daß es sich um dieselbe Substanz handeln könnte, die in verschiedener Konzentration unterschiedliche Effekte zeigt, abhängig auch vom jeweiligen Testsystem (41). Spezifische und unspezifische T-Zell-Faktoren verglichen Waksman und Tada (95). Beide Faktoren seien an verschiedenen immunologischen Reaktionen beteiligt.

Engleman et al. (19) fanden Suppressorzellen in der MLC bei Mitgliedern einer Familie und konnten auch in den MLC-Überständen eine Suppressoraktivität mit Spezifität für den Responder und teilweiser Spezifität für den Stimulator nachweisen.

Belmont et al. (8) untersuchten einen Suppressorfaktor für MLC und fanden, daß die Proteinsynthese, jedoch keine DNA-Synthese Voraussetzung für die Produktion des Suppressorfaktors ist. In Extrakten humaner Lymphozyten wurde ein

Inhibitor für die mitogen- oder alloantigen-induzierte Lymphozyten-Proliferation nachgewiesen. Nichtlymphoide Zellen wurden nicht gehemmt (91). In MLC-Überständen fanden Wolf et al. (100) einen Suppressorfaktor für Proliferationsreaktionen und die Antikörpersynthese. Überstände nicht stimulierter Lymphozyten waren ebenfalls in geringem Maße aktiv (SIF, soluble inhibitory factor).

Auch in Überständen CON A-aktivierter humaner Lymphozyten war ein Faktor mit suppressorischer Wirkung für die allogene MLC nachweisbar (99). Kaufman et al. berichteten, daß CON A-aktivierte Lymphozyten die MLR sowie die Generation zytotoxischer Lymphozyten blocken, während der Überstand CON A-aktivierter Lymphozyten nur MLR und die mitogeninduzierte Blastogenese beeinflusste. Diese Effekte waren keinen genetischen Restriktionen unterworfen (44). Moretta et al. beobachteten eine Immunsuppression durch lösliche Faktoren, die von nicht proliferierenden T-Zellen produziert wurden. Dabei konnte eine Wirkung auf T-Helfer-Zellen festgestellt werden (54).

Fleisher et al. (24) und Greene et al. (32) fanden in den Überständen CON A-aktivierter Zellen suppressive Faktoren (SISS, soluble immune suppressor supernatant) für B-Zell-Immunglobulinproduktion (SISS-B) und T-Zell-Proliferation gegenüber Mitogenen und Antigenen (SISS-T).

Als mögliche Effektormoleküle werden auch Interferone diskutiert, die in der Lage

sind, die zellvermittelte Immunantwort zu supprimieren (42). Die Produktion von gamma-Interferon in der allogenen MLC wurde kürzlich beschrieben (49). Bei der Untersuchung von Überständen aus autologen MLCs beschrieben Yu et al. Helfer-Faktoren, welche die Entwicklung zytotoxischer und antikörperproduzierender Zellen induzieren können (101).

Auf die Rolle des Suppressorzellsystems bei der Aufrechterhaltung der Toleranz und seine mögliche Bedeutung in klinischer Hinsicht wurde bereits hingewiesen. Nach Hallgren und Yunis wird mit zunehmendem Lebensalter ein Suppressorverlust beobachtet, der mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen in Verbindung stehen könnte (33). Für den SLE liegen bereits erste Ergebnisse vor, die für die Präsenz einer verminderten Suppressorzellfunktion sprechen (76). Messner vermutete, daß die T-Zellfunktion bei Bindegewbserkrankungen allgemein eingeschränkt ist (52). Dieser Befund könnte mit auf die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen Lymphozyten zurückzuführen sein, wie sie bei unterschiedlichen Kollagenosen beschrieben wurden. So zeigten Morimoto et al. (55), daß beim SLE anti-T-Zell-Antikörper nachweisbar sind, die mit 80% der Suppressorzellpopulation (T4-) reagieren, nicht aber mit der Helferfraktion (T8-). Für die RA wird ebenfalls die pathogenetische Bedeutung eines Suppressordefektes diskutiert. Bereits 1969 beobachteten Astorga und Williams eine beeinträchtigte MLC-Reaktivität

bei RA-Patienten (2). Die Anzahl von T-Zellen im peripheren Blut von Rheumatikern ist nach einer Arbeit von Burmester et al. vermindert (12). Silverman et al. beobachteten eine erniedrigte Mitogenstimulierbarkeit von PBL bei RA-Patienten (83). Keystone et al. untersuchten die MLC-Reaktivität bei RA-Patienten und fanden eine Steigerung unter Verwendung von gepooltem Humanserum, im Gegensatz zu einer verminderten MLC-Reaktivität, wenn autologes Serum benutzt wurde (45). 1979 zeigten Chattopadhyay et al., daß die Suppressoraktivität von Synovial-lymphozyten von RA-Patienten im Vergleich zu Blutlymphozyten gesunder Kontrollen vermindert war, bei normaler Helferfunktion (14).

Eine verminderte Reaktivität in der autologen MLR beobachteten Sakane et al. bei SLE-Patienten (77), bei der RA wurde dies von Leitner et al. beschrieben (48). Bei der diskutierten möglichen immunregulatorischen Bedeutung der AMLR könnte eine Störung dieses Mechanismus mit für die Manifestation des Krankheitsbildes verantwortlich sein. Nachdem wie bereits erwähnt in vorangegangenen Experimenten im Institut mit Poliklinik für Klinische Immunologie und Rheumatologie der Universität Erlangen gezeigt werden konnte, daß die AMLR bei RA-Patienten signifikant erniedrigt ist (48), war es Ziel der vorliegenden Arbeit festzustellen, ob eine gestörte AMLR bei RA-Patienten einhergeht mit einer verminderten Aktivierung von Suppressorzellen sowie löslichen suppressiven Faktoren.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Testpersonen

Blutspender waren gesunde Kontrollpersonen und Patienten, die nach ARA-Kriterien an Rheumatoider Arthritis erkrankt und für eine Goldtherapie vorgesehen waren.

Benötigte Blutmengen je Spender:

LTT: 20 ml; MLC 60-80 ml; AMLC 150-200 ml
je 20 ml Blut eine Ampulle Vetren (entspricht 200 U Heparin, Promonta GmbH, Hamburg)

Gewinnung der Lymphozyten aus peripherem Blut

Das Blut wird mit PBS-Puffer oder Medium 199 (Flow Laboratories Ltd., Irvine, USA) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Lymphozyten-reiche Fraktion erhält man durch Zentrifugation über einem Ficoll-Dichtegradienten (Lymphocyte Separation Medium, Flow Laboratories Ltd., Irvine, USA). Dazu werden ca. 30 ml des verdünnten Blutes auf je 15 ml Ficoll ($\rho=1.077$) in Zentrifugengläsern überschichtet. Nach dem Zentrifugieren befindet sich die Lymphozyten-reiche Fraktion in der Interphase und kann vorsichtig abpipettiert werden. Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen in Medium bzw. Medium mit 10% hitzeinaktiviertem humanen AB-Serum resuspendiert.

Lymphozyten-Transformationstest (LTT)

Die Lymphozyten werden in Medium mit AB-Serum aufgenommen und auf die erforderliche Konzentration eingestellt (meist 10^6 oder

2×10^6 /ml). Die Ansätze erfolgen in Mikrotiterplatten (Falcon, Oxnard, USA) als Triplicate oder Quadruplicate. Zu je 100 000 Zellen pipettiert man 0.1 ml Mitogenlösung.

Konzentration der Mitogene:

CON A: 50 μ g/ml (Serva Feinbiochemica, Heidelberg)

PHA: 12.5 μ g/ml (Wellcome Reagents Ltd., Beckenham, England)

Im Brutschrank wird bei 37°C und Wasserdampf-gesättigter, 5% CO₂haltiger Luft 48 Stunden lang inkubiert. Dann erfolgt Markierung der Kulturen mit ³H-Thymidin (Radiochemical Centre, Amersham, GB), je Kultur mit 0.05 ml der Lösung (entspricht 1 μ Ci). Die Zellen werden nach weiteren 18-24 Stunden Inkubation mit einem Titertek Cell Harvester geerntet (Flow Laboratories Ltd., Irvine, USA). Messung der in die Zellen aufgenommenen Radioaktivität als Maß für die Proliferation erfolgt mit einem Szintillationszähler (Rackbeta 1216, LKB-Wallac, Turku, Finnland).

Gemischte Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture, MLC)

Für die sekundären MLCs wurde keine Trennung in B- und T-Lymphozyten durchgeführt. Für Responder- und Stimulatorzellen benötigt man jeweils einen Spender. Die Lymphozyten werden in der beschriebenen Weise gewonnen. Die Responderzellen werden in Medium mit AB-Serum aufgenommen. Die Stimulatorzellen behandelt man mit dem Mitosehemmer Mitomycin C

(Serva Feinbiochemica, Heidelberg). Sie sind dann selbst nicht mehr proliferationsfähig, stimulieren aber die Responderzellen im Sinne einer "one way"-Reaktion. Zu je 10^6 Stimulatorzellen gibt man $50 \mu\text{g}$ Mitomycin C (entspricht 0.05 ml der Lösung); die Zellen werden dazu auf $10^6/\text{ml}$ eingestellt. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C im Wasserbad wird einmal gewaschen, dann nochmals 5 min inkubiert. Nach 2-3maligem weiteren Waschen (je nach Zellzahl) werden die Zellen in Medium mit AB-Serum aufgenommen.

Die Kulturen werden in Mikrotiterplatten angesetzt, Stimulator- und Responderzellen im Verhältnis $2:1$, meist $2 \times 10^5:10^5$. Dazu kommen noch die aktivierten Zellen aus primärer MLC bzw. deren Überstände. Leerwerte werden mit Medium (+AB-Serum) ausgeglichen, so daß das Volumen jeweils gleich ist. Die Inkubation erfolgt wie beim LTT.

Am 6. Tag nach Ansetzen der MLC wird mit ^3H -Thymidin markiert ($1 \mu\text{Ci/well}$), nach weiteren 18-24 Stunden geerntet und die eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

Für einige Versuche wurden auch in primärer MLC unfractionierte Lymphozyten verwendet. In diesen Fällen wurden Stimulator- und Responderzellen als "bulk culture" angesetzt, d.h. höhere Zellzahlen in größeren Kulturplatten oder Plastikflaschen (Costar, Cambridge, Mass., USA).

Autologe gemischte Lymphozytenkultur (autologous mixed lymphocyte culture, AMLC) und MLC mit non-T-T-Trennung (Abb.1)

Das Blut wird in der angegebenen Weise gewonnen. Vor Isolierung der Lymphozytenreichen Fraktion werden phagozytierende bzw. adhärenente Zellen entfernt. Das mit PBS-Puffer verdünnte Blut wird dazu mit Eisen-Carbonyl-Suspension versetzt (Lymphocyte Separator Reagent, Technicon Instruments Corp., Tarrytown, N.Y., USA), dann 30 min lang in Plastikflaschen (Costar, Cambridge, Mass., USA) bei 37°C geschüttelt und 45 min in Ruhe inkubiert. Adhärenente Zellen bleiben dabei an der Plastikoberfläche haften. Nach der folgenden Zentrifugation über Ficoll kann zur Beseitigung einer Kontamination mit Erythrozyten 5-10 min in 0.83%iger Ammoniumchloridlösung inkubiert werden. Anschließend werden die Zellen gewaschen und in Medium resuspendiert.

Nun erfolgt die Trennung in non-T- und T-Lymphozyten. Die Zellen werden auf jeweils $30 \times 10^6 / 10$ ml eingestellt. Dazu gibt man je 7 ml einer 2%igen Suspension von Schaf-erythrozyten. Diese werden zuvor mit 0.15 U Neuraminidase (Behringwerke AG, Marburg) pro 100 ml Suspension 30 min lang bei 37°C inkubiert und zweimal in Medium gewaschen. Die Mischung aus Lymphozyten und Schaf-erythrozyten wird nun 5 min bei 37°C inkubiert, mit 800 Upm 3 min anzentrifugiert und dann 3-4 Stunden lang bei 4°C aufbewahrt. Da T-Lymphozyten in der Lage sind, mit

Schaferythrozyten Rosetten zu bilden, ist auf diese Weise eine Trennung von non-T-Lymphozyten möglich.

Nach erfolgter Rosettierung werden die Sedimente vorsichtig aufgeschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation über Ficoll befindet sich die non-T-Fraktion in der Interphase und die rosettenbildende T-Fraktion im Sediment. Die Zellen in der Interphase werden abpipettiert, gewaschen und in Medium resuspendiert. Dann erfolgt die Behandlung mit Mitomycin C, Aufnahme in Medium mit AB-Serum und Einstellen auf die Endkonzentration.

Die Pellets, welche die Rosetten enthalten, werden ebenfalls gesammelt. Die Schaferythrozyten werden mit 0.83%iger Ammoniumchloridlösung lysiert. Nach dem Waschen wird die T-Fraktion ebenfalls in Medium mit AB-Serum aufgenommen.

Mit non-T- und T-Fraktion der einzelnen Spender werden autologe und allogene MLCs angesetzt, non-T-Zellen als Stimulator und T-Zellen als Responder im Verhältnis 1:1 ($10^5:10^5$). Ein Teil der MLCs wird in Mikrotiterplatten angesetzt, Inkubation wie bereits beschrieben. Nach 6 bzw. 7 Tagen erfolgt Bestimmung der Proliferation mittels radioaktiver Markierung und Messung im Szintillationszähler.

Der andere Teil der Zellen wird als "bulk culture" angesetzt und für sekundäre Tests verwendet.

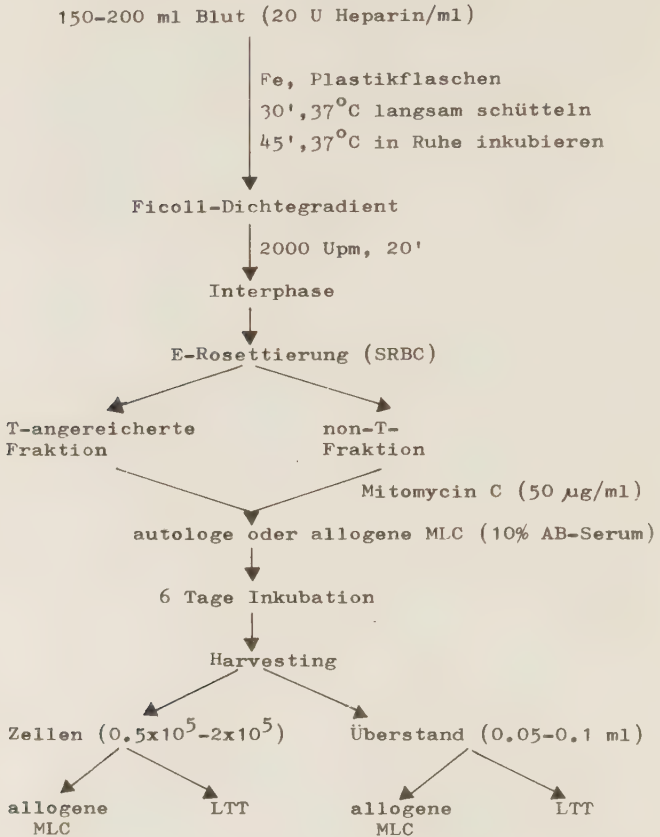
Sekundäre Tests (Abb.1)

Lymphozyten, die in primärer autologer oder allogener MLC aktiviert wurden, werden als "third party" zu sekundären MLCs oder LTTs gegeben. Die prim. MLCs wurden mit non-T-Trennung der Lymphozyten durchgeführt, in einigen Fällen auch mit unfractionierten Zellen. Die sek. Tests erfolgten mit unfractionierten Lymphozyten. Es wurden Zellen und Überstände aus prim. MLCs untersucht.

Die prim. MLCs bzw. AMLCs wurden nach 6 Tagen beendet, die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium mit AB-Serum-Zusatz resuspendiert. Sek. LTTs wurden mit 10^5 Responderzellen, sek. MLCs mit 2×10^5 Stimulator- und 10^5 Responderzellen durchgeführt. Dazu kamen Zellen aus prim. MLC in Ansätzen von 0.5×10^5 bis 2×10^5 Zellen bzw. 0.05 ml oder 0.1 ml Überstand. Leerwerte wurden mit Medium ausgeglichen, um ein einheitliches Volumen zu gewährleisten. Messung der Proliferation nach 6 Tagen Inkubation erfolgte wie bereits beschrieben.

Zur Quantifizierung der Effekte wurde der Stimulationsindex verwendet, welcher sich aus dem Quotienten der CPM-Werte von sek. Test + Zellen/Überstand durch sek. Test-Grundwert errechnet. In diesem Sinne kann man bei einem Stimulationsindex unter 1 von Suppressoreffekten sprechen, z.B. entspricht ein SI von 0.6 40% Suppression.

Abb.1. Methode mit primärer AMLR bzw. MLC mit non-T-T-Trennung und sekundären Tests



ER G E B N I S S E

1. primäre AMLR oder MLC/ sekundärer LTT (gesunde Kontrollen)

Prinzip: LTT wie beschrieben (Responderzellen R + Mitogen). Als "third party" Zellen aus 6-Tage-AMLR (AA_m) oder MLC (AB_m). (m = Mitomycin C-behandelt)

A B_m $\longrightarrow$ R + CON A/PHA

A A_m $\longrightarrow$ R + CON A/PHA

Stimulationsindex: $SI = \frac{LTT + AMLR/MLC\text{-Zellen}}{LTT\text{-Grundwert}}$

Bei der Beurteilung sind die folgenden Einflußgrößen zu berücksichtigen:

- Helfer/Suppressoreffekt AMLR/MLC-aktivierter Zellen auf Proliferation von R
- mögliche Restimulation von A in Form einer Primär- oder Sekundärantwort. Eine Übersicht über derartige Effekte findet sich bei Zier et al. (103) sowie Weksler und Kozak (98).

Der Stimulationsindex gibt also die Summe der möglichen Einflüsse wieder, je nach Überwiegen der einzelnen Effekte.

Tab. 1 zeigt, daß mit den aufgeführten Kombinationen keine Suppression unter den LTT-Grundwert zu erreichen war (bis auf ein Ergebnis mit PHA-Stimulation). Die Proliferation von R bzw. A oder deren additiver Effekt scheint demnach in den meisten Fällen zu überwiegen. Hohe Stimulationen im Vergleich zum Grundwert, ausgelöst durch AMLR/MLC-aktivierte Zellen, lassen sich durch die Annahme einer Sekundärantwort dieser Zellen

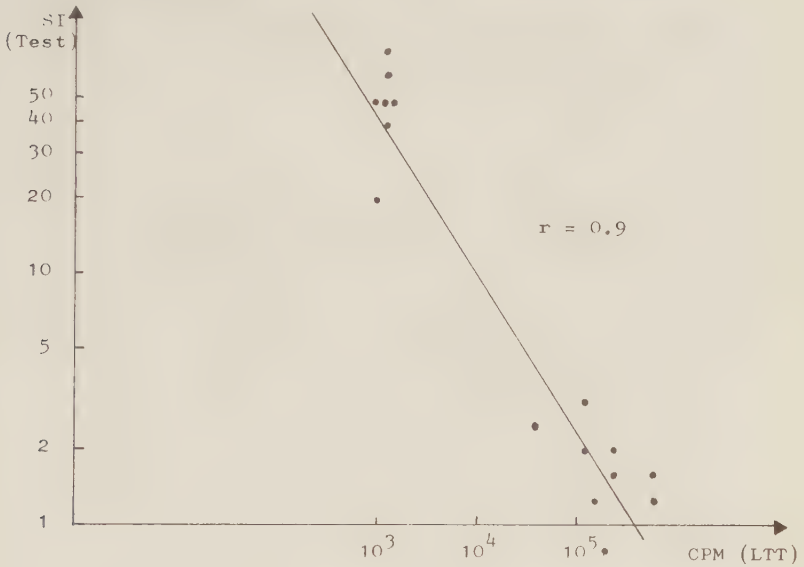
erklären, deren Maximum mit der Beendigung des LTT nach 3 Tagen zusammenfallen würde.

Tab.1

R	Mitogen	prim. MLC	MLC-Zellen LTT-Responder	SI
UG	CON A	UG/JK _m	$0.5 \times 10^5 / 10^5$	1.1
UG	CON A	JK/UG _m	$0.5 \times 10^5 / 10^5$	1.2
SC	CON A	SC/BI _m	$10^5 / 0.5 \times 10^5$	10.6
BI	CON A	BI aut.	$10^5 / 0.5 \times 10^5$	9.4
HS	CON A	HS aut.	$0.5 \times 10^5 / 0.5 \times 10^5$	2.4
HS	CON A	HS aut.	$0.5 \times 10^5 / 10^5$	10.4
JL	CON A	JL/GL _m	$10^5 / 10^5$	3.5
JL	CON A	GL/JL _m	$10^5 / 10^5$	3.4
UG	PHA	UG/JK _m	$0.5 \times 10^5 / 10^5$	1.0
UG	PHA	JK/UG _m	$0.5 \times 10^5 / 10^5$	0.9
JL	PHA	JL/GL _m	$10^5 / 10^5$	3.2
JL	PHA	GL/JL _m	$10^5 / 10^5$	2.6

Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß bereits die Grundwerte der sek. LTTs bei verschiedenen Spendern eine große Streubreite aufweisen. Dies führt dazu, daß letztlich auch die SI der Tests erheblich schwanken. Dabei war zu beobachten, daß bei niedrigem Grundwert durch Hinzufügung der AMLR/MLC-aktivierten Zellen sehr hohe SI erreicht werden, während bei schon hoher Grundstimulation niedrige SI resultieren. Abb.2 zeigt diesen Zusammenhang. Logarithmiert man die jeweiligen CPM- bzw. SI-Werte, so ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.9.

Abb.2. Zusammenhang zwischen sek. LTT-Grundwert und SI mit aktivierten Zellen



Wird statt Zellen aus prim. MLC die gleiche Anzahl frischer Lymphozyten des-selben Spenders in den sek. LTT eingesetzt, so erhält man höhere Stimulationen (Abb.3)

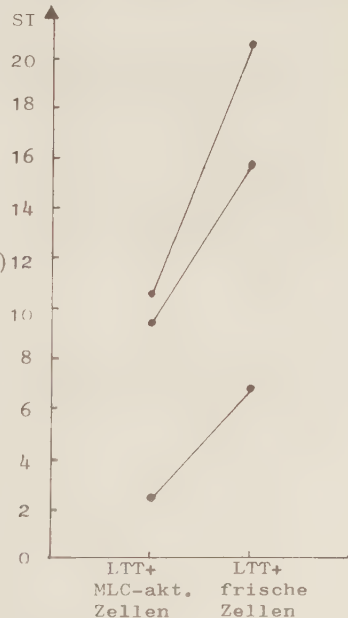


Abb.3. Vergleich des Effektes akt. bzw. frischer Lymphozyten auf sek. LTT

2. primäre AMLR oder MLC/ sekundäre MLC (gesunde Kontrollen)

Prinzip: Zu allogener MLC (RS_m) kommen Zellen aus 6-Tage-AMLR (AA_m) oder MLC (AB_m).

A B_m —————→ R S_m

A A_m —————→ R S_m

Stimulationsindex: $SI = \frac{\text{sek. MLC} + \text{akt. Zellen}}{\text{sek. MLC-Grundwert}}$

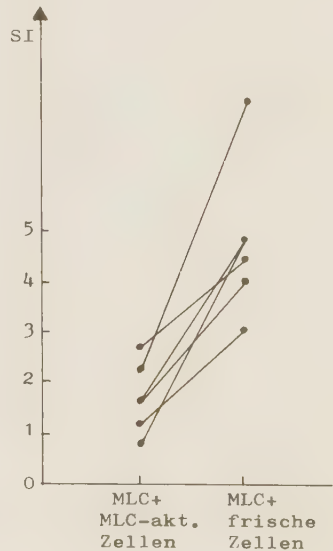
Wie beim LTT-Testsystem sind auch hier verschiedene Einflüsse zu berücksichtigen:

- Helfer/Suppressoreffekt MLC-aktivierter Zellen auf Proliferation von R
- mögliche Restimulation von A als Primär- oder Sekundärantwort

Der Stimulationsindex ergibt sich auch hier aus der Summe der möglichen Effekte.

Werden statt MLC-aktivierter Zellen frische Lymphozyten des (prim.) MLC-Responders in die sek. MLC eingesetzt, so ergeben sich wieder höhere Stimulationen (Abb.4)

Abb.4. Vergleich des Effektes akt. bzw. frischer Lymphozyten auf sek. MLC



Tab.2 zeigt die Ergebnisse einiger Versuche, bei denen in primärer und sekundärer MLC jeweils derselbe Spender als Responder verwendet wurde:



Eine Restimulation von A läßt sich auch hier nicht ausschließen, der Einfluß allogener Effekte könnte jedoch geringer sein als in einem vollständig allogenen Testsystem. Nach den vorliegenden Werten ist dies nicht der Fall; die Höhe der Stimulation scheint eher vom Grundwert der sek. MLC und der Anzahl der eingesetzten Zellen aus prim. MLC abzuhängen, ähnlich wie beim LTT-Testsystem. Bei niedrigem Grundwert werden durch Zugabe der akt. Zellen meist höhere SI erreicht als im umgekehrten Fall, die Korrelation ist aber nicht so deutlich.

Tab.2

sek. MLC	prim. MLC	Zellen aus prim. MLC Responder in sek. MLC	SI
SC/BI _m	SC/BI _m	2.0	2.7
SC/BI _m	SC/BI _m	4.0	2.4
BI/SC _m	BI aut.	2.0	1.6
BI/SC _m	BI aut.	4.0	4.4
BE/WI _m	BE aut.	0.5	6.2
BE/WI _m	BE aut.	1.0	8.7
BE/WI _m	BE aut.	1.5	11.6
PR/EB _m	PR aut.	1.0	1.6
PR/EB _m	PR aut.	2.0	2.3
EB/LE _m	EB/HE _m	1.0	1.7
EB/LE _m	EB/HE _m	2.0	2.6

Tab.2 - Fortsetzung

sek. MLC	prim. MLC	Zellen aus prim. MLC Responder in sek. MLC	SI
BP/GE _m	BP aut.	1.0	12.4
BP/GE _m	BP aut.	2.0	15.8
BP/GE _m	SC/BP _m	1.0	23.5
BP/GE _m	SC/BP _m	2.0	16.9
LH/WI _m	LH aut.	1.0	30.0
LH/WI _m	LH aut.	2.0	28.6
LH/WI _m	LH/Bö _m	0.5	16.5
LH/WI _m	LH/Bö _m	1.0	20.1
LH/WI _m	Bö aut.	0.5	21.0
LH/WI _m	Bö aut.	1.0	23.5
LH/WI _m	Bö/LH _m	1.0	28.1
LH/WI _m	Bö/LH _m	2.0	26.7

Um die Rolle allogener Effekte bzw. einer spezifischen Suppression weiter zu untersuchen, führten wir noch einige Versuche durch, bei denen in prim. und sek. MLC jeweils gleiche Reaktionspartner verwendet wurden:

A B_m —————→ A B_m bzw. A B_m —————→ B A_m

Für diese Versuche wurden auch in die prim. MLC unfractionierte Lymphozyten eingesetzt (Tab.3).

Tab.3

sek. MLC	prim. MLC	Zellen aus prim. MLC Responder in sek. MLC	SI
LG/MK _m	LG/MK _m	1.0	1.2
	LG/MK _m	2.0	0.8
	MK/LG _m	1.0	4.6
	MK/LG _m	2.0	7.0
	GE aut.	2.0	1.0
MK/LG _m	MK/LG _m	1.0	6.0
	MK/LG _m	2.0	10.8
	LG/MK _m	1.0	4.8
	LG/MK _m	2.0	5.9
	GE aut.	2.0	1.5
UG/AS _m	UG/AS _m	0.5	1.8
	UG/AS _m	1.0	1.9
	UG/AS _m	2.0	1.4
	AS/UG _m	0.5	0.7
	AS/UG _m	1.0	0.4
	AS/UG _m	2.0	0.1
AS/UG _m	AS/UG _m	0.5	0.7
	AS/UG _m	1.0	0.5
	AS/UG _m	2.0	0.1
	AS/UG _m	3.0	0.1
	UG/AS _m	0.5	1.3
	UG/AS _m	1.0	1.1
US/WR _m	US/WR _m	1.0	2.0
	US/WR _m	2.0	3.0
	US/WR _m	3.0	3.3

Tab.3 - Fortsetzung

sek. MLC	prim. MLC	Zellen aus prim. MLC Responder in sek. MLC	SI
US/WR _m	WR/US _m	1.0	4.9
	WR/US _m	2.0	7.5
	WR/US _m	3.0	7.8
WR/US _m	WR/US _m	1.0	2.6
	WR/US _m	2.0	1.6
	WR/US _m	3.0	3.1
	US/WR _m	1.0	4.7
	US/WR _m	2.0	12.2
	US/WR _m	3.0	11.7
MW/UG _m	MW/UG _m	1.0	1.6
	MW/UG _m	2.0	4.7
	MW/UG _m	3.0	7.3
	UG/MW _m	1.0	5.9
	UG/MW _m	2.0	17.9
	UG/MW _m	3.0	16.9
UG/MW _m	UG/MW _m	2.0	7.3
	UG/MW _m	3.0	10.3
	MW/UG _m	1.0	5.5
	MW/UG _m	2.0	7.9
	MW/UG _m	3.0	9.5
RE aut.	RE aut.	1.0	1.0
	RE aut.	2.0	1.3
	RE aut.	3.0	0.9

Suppression unter den Leerwert der sek. MLC
wurde nur in einem Fall beobachtet (AS/UG_m),

mit Erhöhung der Zahl der MLC-aktivierten Zellen auch Zunahme des Effektes. Dabei war auch in der reziproken sekundären MLC die gleiche Suppression zu erzielen. Ansonsten wurde auch hier durch Zellen aus prim. MLC eine Erhöhung der Stimulation bewirkt.

3. Vergleich von RA-Patienten und gesunden Kontrollen hinsichtlich der Aktivität von Zellen aus primärer AMLR/MLC in sek. MLC

Testsystem: A B_m $\longrightarrow$ R S_m
 A A_m $\longrightarrow$ R S_m

In der prim. MLC wurden als Stimulatoren non-T-Zellen, als Responder T-Zellen verwendet, die sek. MLC wurde mit unfractionierten Lymphozyten durchgeführt. Die Schwierigkeit bei der Beurteilung der Ergebnisse liegt darin, daß für die Gesamtproliferation verschiedene Einflüsse maßgebend sind, und daß die MLC-Proliferationen an sich schon eine große Bandbreite aufweisen. Da Patient und Kontrolle aber jeweils dengleichen Bedingungen unterworfen sind, erlaubt der Vergleich der beiden Gruppen doch Aussagen über etwaige Unterschiede.

Wie aus Tab.4 ersichtlich ist, besteht zwischen Stimulationsindex der primären AMLR oder MLC und SI in der sekundären MLC kein Zusammenhang. Es scheint, daß die sek. Tests in starkem Maße durch ihren eigenen Leerwert beeinflusst werden, so daß eine mögliche Korrelation zwischen prim. und sek. MLC überdeckt wird.

Tab.4

RA-Patienten, n=16	
SI prim. AMLR	SI sek. MLC
0.6	2.9
1.0	2.6
1.6	3.0
1.8	2.2
2.1	11.1
2.1	5.0
3.2	19.6
3.2	2.5
3.6	1.1
4.1	17.0
4.2	2.9
6.4	3.8
7.6	5.5
14.7	3.9
	2.1
	1.3

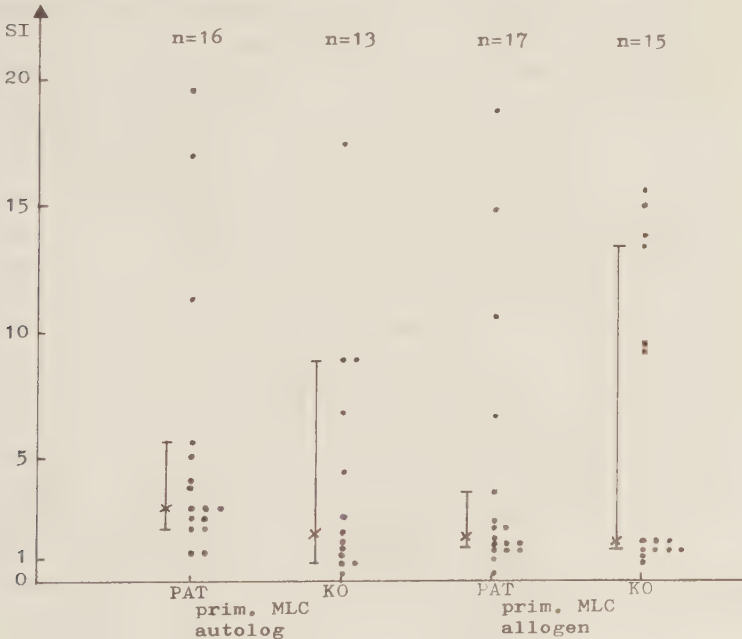
Kontrollen, n=13	
SI prim. AMLR	SI sek. MLC
0.9	4.5
1.3	1.9
4.3	6.8
7.4	8.7
11.8	8.9
19.0	2.6
	0.8
	1.4
	0.2
	1.0
	1.6
	0.9
	17.3

RA-Patienten, n=17	
SI prim. MLC	SI sek. MLC
2.2	6.6
3.9	1.3
22.2	1.7
28.9	1.5
36.5	2.2
45.0	1.1
47.8	18.9
67.7	10.5
89.7	2.5
125.1	14.8
165.1	1.7
	2.3
	1.7
	3.6
	1.4
	1.4
	0.2

Kontrollen, n=15	
SI prim. MLC	SI sek. MLC
7.5	1.7
14.1	9.2
21.4	1.4
38.1	1.3
38.9	15.6
41.6	9.4
46.9	13.7
51.6	1.5
60.4	13.3
76.3	15.0
85.8	1.5
	1.2
	1.0
	1.7
	1.6

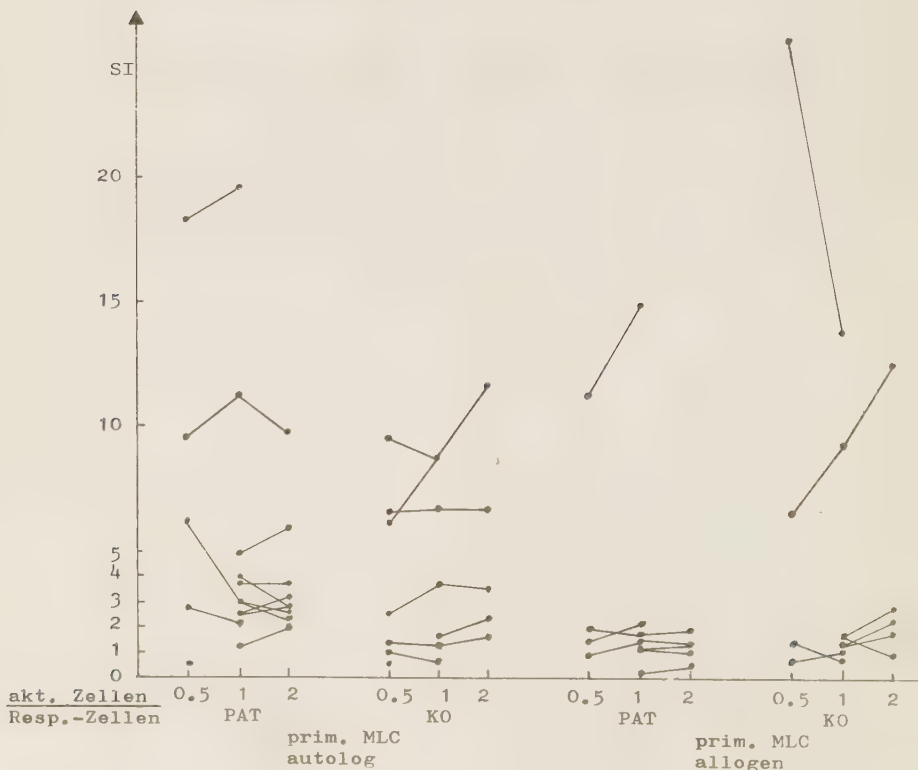
Abb.5 zeigt die SI der sek. MLCs mit akt. Lymphozyten aus AMLRs und MLCs von RA-Patienten und Kontrollen. Angegeben ist jeweils der Median und sein 95%-Vertrauensbereich. Die Werte für die einzelnen Gruppen sind: Pat. autol. $2.2 \leq 3.0 \leq 5.5$; Ko. autol. $0.9 \leq 1.9 \leq 8.7$; Pat. allog. $1.4 \leq 1.7 \leq 3.6$; Ko. allog. $1.4 \leq 1.7 \leq 13.3$. Der U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen autologen Patienten und Kontrollen bzw. allogenen Patienten und Kontrollen. Zwischen autologen und allogenen Patienten errechnet sich ein Unterschied mit $p \leq 0.05$, während dies zwischen autologen und allogenen Kontrollen nicht der Fall ist.

Abb.5. Vergleich des Effektes AMLR- und MLC-aktivierter Zellen von RA-Patienten und Kontrollen auf sek. allogene MLC



In Abb.6 ist dargestellt, wie sich die Änderung der Zahl von MLC-aktivierten Zellen auf die sek. MLC auswirkt. Durch Erhöhung von 50 000 auf 100 000 bzw. von 100 000 auf 200 000 wurde in einigen Fällen eine Erniedrigung des SI bewirkt (Responderzellen in sek. MLC 100 000), was auch für die Beteiligung eines suppressiven Effektes sprechen könnte. Es wurde jedoch auch der gegenteilige Effekt beobachtet, gleichermaßen bei Patienten und Kontrollen.

Abb.6. Effekt verschiedener Zahlen aktivierter Zellen auf sek. MLC



4. Überstände aus primärer AMLR oder MLC/
sek. MLC und LTT, RA-Patienten und Kontrollen

Ebenso wie die Zellen aus prim. AMLR und MLC wurden auch die Überstände hinsichtlich ihrer Wirkung auf sek. MLC und LTT untersucht:

A B_m-Überstand → R S_m bzw. A A_m-Überstand → R S_m

A B_m-Überstand → R+CON A bzw. A A_m-Überstand → R+CON A

Stimulationsindex: $SI = \frac{\text{sek. MLC/LTT} + \text{Überstand}}{\text{sek. MLC/LTT-Grundwert}}$

Zu den Testansätzen wurden jeweils 0.05 ml bzw. 0.1 ml Überstand gegeben, Leerwerte wurden mit Medium ausgeglichen.

In einigen Überständen ließen wir T-cell growth factor (TCGF) (Dr. Solbach, Dr. Röllinghoff, Institut für Mikrobiologie, Universität Mainz) und Interferon bestimmen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kirchner, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg).

Zwischen Proliferationsrate der prim. MLC und der Hemmwirkung der Überstände auf sek. MLC/LTT ergab sich kein Zusammenhang. TCGF-positive Überstände hatten im Gegensatz zu den meisten anderen Überständen keine suppressive Wirkung auf sek. MLC; sie wurden in Abb.7 und 8 nicht berücksichtigt. Der LTT wurde durch TCGF weniger beeinflußt. TCGF sowie niedrige Titer von Interferon fanden sich fast ausschließlich in Überständen aus allogenen MLCs. Zwischen Interferontiter und Proliferation in prim. bzw. sek. MLC fand sich kein deutlicher Zusammenhang, während TCGF vorwiegend in prim. MLCs mit hoher Proliferationsrate produziert wurde.

Tab.5 faßt einige der genannten Resultate zusammen:

Tab.5

SI prim. MLC	IF	TCGF	SI sek. MLC 0.05 ml 0.1 ml		Überstand von
3.2		+	0.74	0.95	Pat. aut.
3.8		+	0.83	0.93	Pat. aut.
		+	1.33	1.42	Ko. aut.
11.8		+	0.72	1.11	Ko. aut.
1.2	0		0.92	0.76	Pat. allo.
22.2	17		0.86	0.94	"
28.9	24	+	1.25		"
36.5	10	+		1.20	"
39.4			0.63	0.56	"
47.8		+	4.00	5.51	"
67.7	23		0.28	0.29	"
89.7	8	+	0.97		"
125.1		+	2.34	4.77	"
165.1	20	+	1.14		"
1.3	0		1.04	0.94	Ko. allo.
1.3	8		0.91	0.93	"
	6		0.71	0.66	"
	6		0.69	0.65	"
7.5	0		1.06	1.13	"
14.1					"
18.3	0		0.44	0.33	"
21.4	27		0.42	0.29	"
22.5	13		0.85	0.92	"
38.1	9	+	1.30		"
38.9	10		1.13	0.97	"
51.6	6	+		1.08	"
85.8	16	+	1.34		"

Den suppressiven Effekt der AMLR- und MLC-Überstände auf die sek. MLC zeigen Abb.7 für 0.05 ml Überstand und Abb.8 für 0.1 ml.

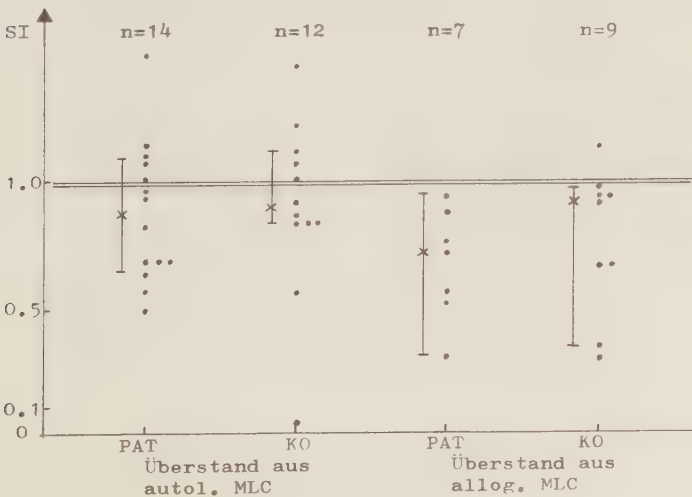
Angegeben ist jeweils der Median und sein 95%-Vertrauensbereich. Die Werte für die einzelnen Gruppen sind in Abb.7:

Pat. autol. $0.72 \pm 0.83 \leq 1.06$; Ko. autol. $0.41 \pm 0.80 \leq 1.02$;
Pat. allog. $0.28 \pm 0.80 \leq 1.15$; Ko. allog. $0.44 \pm 0.85 \leq 1.06$.

Abb.7. Wirkung von 0.05 ml Überstand aus prim. AMLR/MLC auf sek. allogene MLC



Abb.8. Wirkung von 0.1 ml Überstand aus prim. AMLR/MLC auf sek. allogene MLC



In Abb.8:

Pat. autol. $0.64 \leq 0.87 \leq 1.10$; Ko. autol. $0.83 \leq 0.89 \leq 1.11$;

Pat. allog. $0.29 \leq 0.72 \leq 0.94$; Ko. allog. $0.33 \leq 0.92 \leq 0.97$.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

fanden sich nicht, auch nicht mit sek. LTT

(Abb.9). Auf den sek. LTT (mit CON A) war

die suppressive Wirkung der Überstände größer

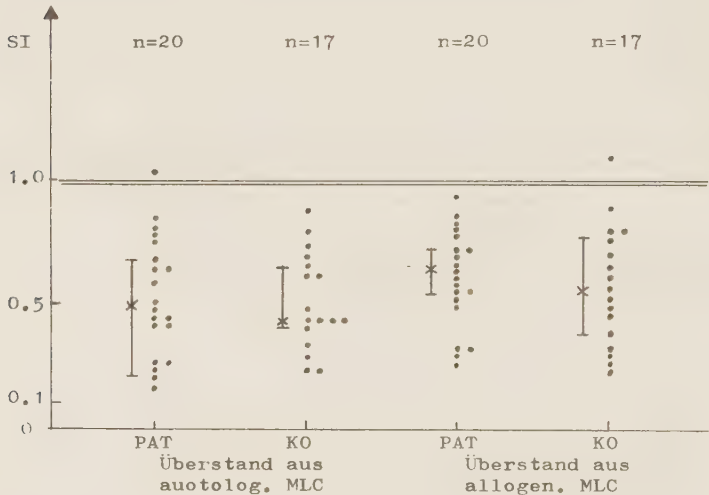
als auf sek. allogene MLC. Mediane und

Vertrauensbereiche sind hier:

Pat. autol. $0.42 \leq 0.49 \leq 0.67$; Ko. autol. $0.41 \leq 0.44 \leq 0.65$;

Pat. allog. $0.53 \leq 0.63 \leq 0.72$; Ko. allog. $0.38 \leq 0.56 \leq 0.76$.

Abb.9. Wirkung von 0.1 ml Überstand aus prim.
AMLR/MLC auf sek. LTT mit CON A-Stimulation



D I S K U S S I O N

Im Rahmen einer mitogenen oder alloantigenen in vitro-Lymphozytenstimulation werden verschiedene humorale und zelluläre immunregulatorische Effektormechanismen aktiviert, die in den letzten Jahren beim Versuchstier wie im humanen System intensiv untersucht wurden.

Die Stimulation durch die pflanzlichen Mitogene CON A und PHA erfaßt hauptsächlich T-Zellen. Diese polyklonale Stimulation führt zur Transformation ruhender Lymphozyten zu Lymphoblasten, zu zahlreichen biochemischen Aktivitäten, Protein- und DNA-Synthese.

Die DNA-Synthese wird als Maß für den Grad der Proliferation verwendet. Das jeweilige Assaysystem unterliegt jedoch Einflüssen von Seiten der Zellkonzentration, Medien, Seren, Mitogendosis, Beschaffenheit der Kulturgefäße, Inkubationszeit, Kontamination mit Mikroorganismen und Art des "Harvesting". Die Höhe der Proliferation hängt weiterhin von in der Kultur aktivierten immunregulatorischen Einflüssen ab (87).

Die gleichen Faktoren beeinflussen die gemischte Lymphozytenkultur, welche einen Sonderfall der Antigenstimulation darstellt, bei dem Lymphozyten gegen fremde Histo-kompatibilitätsantigene antworten. Werden Lymphozyten zweier unverwandter Individuen zusammen kultiviert, so finden sich nach einigen Tagen in der Kultur Lymphoblasten. Für diese Reaktion sind Unterschiede in HLA-D-Antigenen der beteiligten Spender von Bedeutung. Bei der "one way"-Reaktion

werden die Lymphozyten des einen Partners mit Mitomycin C behandelt oder bestrahlt, so daß sie sich nicht mehr selbst teilen können; sie sind jedoch noch in der Lage, Zellen des anderen Reaktionspartners zur Proliferation zu stimulieren. Als Responderzellen in der allogenen MLC konnten T-Lymphozyten identifiziert werden; die für die Stimulation verantwortlichen (Ia-ähnlichen) Antigene scheinen vornehmlich auf B-Lymphozyten und Makrophagen ausgeprägt und mit HLA-D-Antigenen identisch zu sein (87). Die Anzahl der in der allogenen MLC stimulierten Zellen wurde auf 3-6% der eingesetzten T-Zellen geschätzt (31).

1975 fanden Opetz et al. (60), daß T-Lymphozyten nicht nur durch allogeneische non-T-Zellen, sondern auch durch non-T-Lymphozyten desselben Individuums zur Proliferation stimuliert werden können. Hinweise, daß es sich bei dieser sogenannten "autologous mixed lymphocyte reaction" (AMLR) tatsächlich um eine Immunreaktion handelt, wurden von Weksler und Kozak (98) erbracht, die nachwiesen, daß die AMLR immunologisches Gedächtnis und Spezifität besitzt. Unterschiede der Responderpopulationen in autologer und allogener MLC fanden Sakane und Green (78). Die autoreaktiven T-Zellen sollen eine höhere Anzahl potentieller Suppressorzellen enthalten.

Eine Tatsache, deren Bedeutung bisher unklar ist, besteht darin, daß allogene

und autologe MLCs gesunder Personen eine große Streubreite in ihrer Proliferationsrate aufweisen. Bis zu 10% gesunder Personen sind "low responder", d.h., ihre Lymphozyten proliferieren nur schwach. Als Ursache werden Virusinfektionen diskutiert, meistens läßt sich jedoch kein Grund angeben. Der momentane Aktivitätszustand des Immunsystems spielt wahrscheinlich eine Rolle. In gleicher Weise wurden individuelle Unterschiede in der Produktion von Regulatorzellen beobachtet (10,82,85).

Neben diesen bekannten individuellen Schwankungen in allogenen und autologen MLCs ist ein weiteres Problem bei der Anwendung von sek. MLC oder LTT als Assaysysteme für Regulatorzellen, daß die aktivierte primäre Regulatorzellpopulation noch proliferationsfähige Zellen enthält, was zur Überlagerung der beiden MLCs und möglicherweise zur Maskierung eines Suppressoreffektes führt. Restimulation der prim. MLC kann dabei als Primär- oder Sekundärantwort auftreten, je nach Kombination der beteiligten Spender und Art der stimulierenden Lymphozytenpopulation (98,103). Um dies auszuschließen, wurden aktivierte Zellen vor Einsetzen in die sek. MLC von einigen Autoren Mitomycin-behandelt oder bestrahlt (38,75, 79,82). Andere Arbeiten -vor allem mit MLC- und AMLR-aktivierten Lymphozyten- zeigten jedoch, daß durch diese Behandlung der Suppressoreffekt abgeschwächt wird oder verloren geht (10,23,26,74,85,96). Daher führten wir in den vorliegenden Experimenten keine Mitomycin-Behandlung der aktivierten

Zellen aus prim. MLCs durch.

In Bezug auf die Aktivierung von Lymphozyten scheinen zwischen T-Zell-Subpopulationen, die durch monoklonale Antikörper zu identifizieren sind (65,66), Unterschiede hinsichtlich ihrer Stimulierbarkeit durch Mitogene und Antigene zu bestehen. So fanden einige Autoren, daß Suppressorzellen in einer T-Zell-Fraktion entstehen, die selbst kaum proliferiert (54,75). Dies würde eine fehlende Korrelation zwischen Proliferation in prim. MLC und Suppressoreffekt der aktivierten Zellen erklären, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde. Umgekehrt wurde jedoch auch eine Proliferationsabhängigkeit für die Entwicklung von Suppressoreffekten beschrieben (74). In jedem Fall muß eine Proteinsynthese zur Erzeugung suppressorischer Mediatoren stattfinden.

Zur Quantifizierung des Suppressoreffektes wurden von den Autoren unterschiedliche Verfahren angewendet. In früheren Studien unter Verwendung von CON A-aktivierten Suppressorzellen wurde die Wirkung der aktivierten Zellen mit der von "Kontrollzellen" verglichen, die ohne Mitogen bei gleicher Zeit inkubiert worden waren (75, 76,81). Bei dieser Form der "Suppressor"-Interpretation ist jedoch zu berücksichtigen, daß nach McCombs et al. (50) sowie Fernandez und Macsween (22) vorinkubierte Lymphozyten einen Helfereffekt besitzen, so daß eine vergleichsweise niedrige Proliferation

mit aktivierten Zellen nicht notwendig einen Suppressoreffekt anzeigt.

In der vorliegenden Arbeit benutzten wir als Kriterium für die Suppression eine Verminderung der Proliferation im sek. Testsystem unter dessen Grundwert (siehe "Material und Methoden"), d.h. ein SI unter 1. Mit akt. Zellen aus prim. AMLR/MLC konnten wir einen solchen Effekt bei den meisten Patienten und Kontrollen nicht nachweisen. Entsprechende Ergebnisse, d.h. keine Hemmung der Proliferation durch Zugabe akt. Suppressorzellen fanden Birnbaum und Swick (10) bzw. Haynes und Fauci (34).

Bei den eigenen Untersuchungen führten in einigen Fällen akt. Zellen aus prim. MLCs zu sehr hohen Stimulationen, besonders dann, wenn der Grundwert der sek. MLC oder des LTT niedrig war. Eine Erklärung für dieses Phänomen läßt sich aus Untersuchungen von Zier et al. (103) ableiten, die eine starke Restimulation in sek. MLC nach primärer Sensibilisierung mit non-T-Zellen beobachteten. Weiterhin ist auch ein Helfereffekt durch Zellen aus prim. MLCs zu diskutieren, wie er bei vorinkubierten Zellen zu finden ist (50). Wurden anstelle MLC-aktivierter Zellen entsprechende frische Lymphozyten eingesetzt, so ergaben sich in unseren Experimenten in allen Fällen höhere Stimulationsraten. Dieser Befund ist wahrscheinlich auf die höhere Anzahl proliferationsfähiger Zellen zurückzuführen.

Einige Untersucher wiesen darauf hin, daß zwischen der Suppressor- und ihrer "Target"zelle

HLA-Restriktionen bestehen, mit einer diskutierten Übereinstimmung im HLA-D-Bereich (18). Andere Autoren konnten diese Hypothese jedoch nicht bestätigen (28,74) und erzielten Suppressoreffekte in vollständig allogenen Systemen. Der Effekt scheint jedoch auf autologe Zellen stärker ausgeprägt zu sein als auf allogene. Dies kann für eine Spezifität der Suppressorzelle sprechen, aber auch auf allogene Effekte zurückzuführen sein. Um derartige Probleme zu umgehen, verwendeten verschiedene Arbeitsgruppen in prim. und sek. MLC jeweils dieselbe Stimulator/Responder-Kombination (26,36, 63,81) oder zumindest dieselben Responder (23,38,64,75,85). Restimulation in sek. MLC ist jedoch auch durch autologe Zellen möglich (103), der Einfluß zusätzlicher allogener Effekte könnte jedoch geringer sein.

Bei der Untersuchung von Patientenlymphozyten mit solchen autologen Testsystemen ergibt sich das Problem, daß die Zellen der sek. MLC denselben Einschränkungen unterworfen sind wie die Zellen aus prim. MLC, deren Wirkung untersucht werden soll. Es ist daher günstiger, für die sek. MLC gesunde Personen als Spender zu verwenden.

Bei unseren Versuchen mit autologen Testsystemen zeigte sich kein deutlicher Suppressoreffekt. Nur in einem Experiment beobachteten wir eine starke Inhibition der sek. MLC, die mit Erhöhung der Zahl der akt. Zellen zunahm. Auch mit der reziproken Stimulator/Responder-Kombination in der sek. MLC zeigte sich dasselbe Ergebnis. Die beteiligten

Spender waren gesunde Kontrollpersonen. Vereinzelt sahen wir auch im allogenen System Suppression, ohne daß sich hierfür Gründe angeben lassen.

Beim Vergleich von RA-Patienten und Kontrollen fand sich kein Unterschied hinsichtlich der Aktivität von Lymphozyten aus prim. AMLR/MLC in sek. MLC. Ebenso ergab sich in der Gruppe der Patienten keine Korrelation zum Krankheitsverlauf. Dies ist im Gegensatz zu Befunden bei Patienten mit einem SLE, bei denen ein Verlust von Suppressorzellen berichtet wurde (76). Nach Morimoto et al. treten dabei anti-T-Zell-Antikörper auf, die selektiv an Suppressorzellen binden (55). Von der eingeschränkten Suppressorfunktion werden jedoch nicht alle T-Zell-Funktionen betroffen (76).

Nach den Vorstellungen einiger Autoren ist eine abweichende Reaktivität in der autologen MLC ein möglicher pathogenetischer Faktor für derartige immunologische Regulationsstörungen (39,77,85). Leitner et al. (48) haben in einer Arbeit an unserem Institut zeigen können, daß bei der Rheumatoiden Arthritis die AMLR-Proliferation im Vergleich zu Gesunden vermindert ist. Eingeschränkte T-Zell-Funktionen bei der RA konnten Burmester et al. (12) vor allem bei Synoviallymphozyten nachweisen, während bei peripheren Blutlymphozyten die Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen nicht so deutlich waren. Chattopadhyay et al. fanden normale Helferfunktion bei RA-Synoviallymphozyten, jedoch keine Suppressoraktivität (14).

Eine verminderte Stimulierbarkeit peripherer Blutlymphozyten von RA-Patienten mit T-Zell-Mitogenen beschrieben Silverman et al., dies vor allem bei höhergradigem Gelenkbefall (83). Astorga und Williams fanden eine erniedrigte MLC, wenn Patientenlymphozyten zusammen kultiviert wurden. Setzte man eine gesunde Person als Stimulator oder Responder ein, so reagierten auch die Patientenlymphozyten normal (2). Entsprechendes scheint auch für die in unserer Arbeit durchgeführten allogenen MLCs mit RA-Patienten zuzutreffen.

Zellen aus autologen MLCs von RA-Patienten führten im Vergleich zu solchen aus allogenen MLCs zu signifikant höheren Proliferationen in sek. MLC. Autolog stimulierte Patientenlymphozyten zeigten hier also ein anderes Verhalten als allogene stimulierte. Falls ein zellulärer Defekt vorliegt, scheint dieser zumindest nicht auf die T-Zell-Fraktion beschränkt zu sein, sondern auch die Stimulatorfraktion zu betreffen. Möglicherweise führt erst die Kombination bestimmter zellulärer Defekte zur gestörten Immunregulation. Offen bleibt dabei, ob es sich bei diesen Erscheinungen um ein sekundäres Phänomen handelt, welches zwar die Krankheit aufrechterhält und deren Aktivität bestimmt, aber durch andere Faktoren erst induziert wird.

Im Laufe der Untersuchungen über Immunregulation und deren Mechanismen gewannen auch humorale Faktoren an Bedeutung. Eine Fülle löslicher Produkte von Lymphozyten wurde

beschrieben (Übersicht in 94), einige davon mit Suppressoreigenschaften: Lymphotoxin (LT), Interferon (IF), proliferation inhibitory factor (PIF), inhibitor of DNA synthesis (IDS), soluble inhibitory factor (SIF), soluble immune response suppressor (SIRS), histamine-induced suppressor factor, soluble immune suppressor supernatant (SISS). Die jeweiligen Faktoren wurden durch Antigen-, MLC- oder Mitogen-Aktivierung von Lymphozyten erhalten. In den Kulturüberständen fanden sich die beschriebenen Aktivitäten. Deren suppressive Wirkung wurde mit verschiedenen Testsystemen nachgewiesen. Durch Verwendung von Überständen statt Zellen in sek. Proliferationstests lassen sich allogene Effekte offenbar weitgehend ausschließen.

Durch Überstände aktivierter Lymphozyten ließen sich PFC-response (70,90), Mitogen-stimulation (32,91) und auch die Proliferation in einer sek. MLC hemmen (8,19,44,72,73,99).

Viele Befunde sprechen dafür, daß diese Faktoren von proliferierenden T-Zellen produziert werden (8,19,58,99,100).

Moretta et al. fanden jedoch auch einen Suppressorfaktor, der von nicht proliferierenden T-Zellen produziert wurde (54).

Wie bei den zellulären Untersuchungen fand man auch für einige Faktoren genetische Restriktionen (72,73,89). Andere Autoren beschrieben unspezifische Wirkungen (44,95). Engleman et al. fanden einen HLA-D-spezifischen Suppressorfaktor (19); Rich und Rich hatten einen ähnlichen Faktor bei H-2-kompatiblen Mäusstämmen beschrieben (73).

In der autologen MLC wurden bisher keine

Faktoren mit Suppressorwirkung gefunden; Yu et al. berichteten über Helferfaktoren für Antikörpersynthese und Generation zytotoxischer Lymphozyten (101).

Bei unseren Versuchen zeigte sich, daß Überstände aus allogenen und aus autologen MLCs Suppressorfaktoren für proliferative Immunantworten enthalten. Nach Kadish et al. kann auch Interferon eine immunsuppressive Wirkung besitzen (42). Manger et al. beschrieben kürzlich die Produktion von gamma-Interferon in der allogenen humanen MLC (49). Auch in unseren allogenen MLCs waren -allerdings niedrige- Interferontiter nachweisbar. Ähnlich geringe Titer beobachteten auch Greene et al. (32). Da jedoch auch Überstände aus autologen MLCs suppressiv waren und zwischen Interferontiter und Hemmwirkung keine Korrelation bestand, erscheint eine Erklärung der Effekte durch Interferonwirkung unwahrscheinlich.

Für die fehlende Aktivität einiger Überstände scheint TCGF verantwortlich zu sein, der ebenfalls vorwiegend in allogenen MLCs nachgewiesen wurde, vor allem bei höherer Proliferationsrate. Der TCGF-Einfluß zeigte sich vorwiegend auf die sek. MLC, weniger auf LTT, was wohl mit dem verschiedenen Stimulationsmechanismus in beiden Systemen zusammenhängt.

Die Suppressorwirkung der Überstände auf sek. MLCs war geringer als auf sek. CON A-Stimulation. Möglicherweise bindet der Suppressorfaktor an Mitogenrezeptoren. Zwischen Überständen aus autologen und

allogenen MLCs ergaben sich keine Unterschiede der Suppressorwirkung, ebenso nicht zwischen RA-Patienten und Kontrollen. Auch zwischen Suppressorwirkung und Proliferationsrate in prim. MLC zeigte sich keine Korrelation. Dies liegt teilweise sicherlich daran, daß die Überstände unterschiedliche humorale Faktoren enthalten; möglich ist auch eine unterschiedliche Beeinflußbarkeit der Targetzellen. Nach unseren Ergebnissen besteht für lösliche Suppressorfaktoren jedoch keine ausgeprägte HLA-Restriktivität. Durch die AMLR- und MLC-Überstände wurde unspezifische Suppression der sek. Proliferationstests bewirkt.

Die humoralen Faktoren werden offenbar von aktivierten T-Zellen produziert, gleichgültig, ob eine autologe oder allogene Stimulation erfolgt.

Zwischen Lymphozyten bzw. humoralen Faktoren von RA-Patienten und Gesunden zeigte sich in den untersuchten Funktionen kein deutlicher Unterschied. Dabei ist zu berücksichtigen, daß in vivo die Zellen des Immunsystems Bedingungen unterworfen sind, die von denen im Test erheblich abweichen können. Da die Vorgänge bei der Immunregulation auch beim Gesunden noch nicht bis ins Detail aufgedeckt sind, ist sicherlich noch viel Forschungsarbeit notwendig, um zu einem umfassenden Verständnis der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu gelangen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Untersucht wurden aktivierte Zellen und Überstände aus AMLRs und MLCs von RA-Patienten und gesunden Kontrollen im Hinblick auf eine Suppressorwirkung auf sekundäre Proliferations-tests (allogene MLC bzw. LTT mit CON A-Stimulation). Während mit aktivierten Zellen kein Suppressor-effekt auf die sekundären Testsysteme zu erzielen war, führten die Überstände aus AMLRs und MLCs zur Proliferationshemmung in der sek. allogenen MLC und im LTT mit CON A. Zwischen RA-Patienten und Kontrollen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

L I T E R A T U R

1. Arrenbrecht, S. & Mitchell, G.F. T Cell-dependent Helper and Suppressive Influences in an Adoptive IgG Antibody Response. Immunology 28,485,1975
2. Astorga, G.P. & Williams Jr., R.C. Altered Reactivity in Mixed Lymphocyte Culture of Lymphocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. Arthr. and Rheum. 12,547,1969
3. Badger, A.M., Cooperband, S.R. & Green, J.A. Studies on the Mechanism of Action of Proliferation Inhibitory Factor (PIF). Cell. Immunol. 13,335,1974
4. Baker, P.J., Barth, R.F., Stashak, P.W. & Amsbaugh, D.F. Enhancement of the Antibody Response to Type III Pneumococcal Polysaccharide in Mice Treated with Anti-lymphocyte Serum. J. Immunol. 104,1313,1970
5. Baker, P.J., Stashak, P.W., Amsbaugh, D.F., Prescott, B. & Barth, R.F. Evidence for the Existence of Two Functionally Distinct Types of Cells Which Regulate the Antibody Response to Type III Pneumococcal Polysaccharide. J. Immunol. 105,1581,1970
6. Basten, A., Miller, J.F.A.P. & Johnson, P. T Cell-Dependent Suppression of an Anti-Hapten Antibody Response. Transplant. Rev. 26,130,1975
7. Bean, M.A., Kodera, Y., Cummings, K.B. &

- Bloom, B.R. Occurrence of Restricted
Suppressor T-Cell Activity in Man.
J. Exp. Med. 146,1455,1977
8. Belmont, J.W., Rich, R.R. & Rich, S.S.
Physiology of Mixed Leukocyte Reaction
Suppressor Factor: I. Role of Cytoskeleton
and Protein Synthesis in Production and
Secretion. J. Immunol. 122,1022,1979
9. Benacerraf, B., Kapp, J.A., Debré, P.,
Pierce, C.W. & de la Croix, F. The
Stimulation of Specific Suppressor T Cells
in Genetic Non-Responder Mice by Linear
Random Copolymers of L-Amino Acids.
Transplant. Rev. 26,22,1975
10. Birnbaum, G. & Swick, L. Human Suppressor
Lymphocytes: I. Induction and Characterization.
Cell. Immunol. 40,16,1978
11. Borkowsky, W. & Valentine, F.T. The
Proliferative Response of Human Lymphocytes
to Antigen is Suppressed Preferentially
by Lymphocytes Precultured with the Same
Antigen. J. Immunol. 122,1867,1979
12. Burmester, G.R., Kalden, J.R., Peter, H.H.,
Schedel, I., Beck, P. & Wittenborg, A.
Immunological and Functional Characteristics
of Peripheral Blood and Synovial Fluid
Lymphocytes from Patients with Rheumatoid
Arthritis. Scand. J. Immunol. 7,405,1978
13. Chan, E.L., Kan, P.B. & Mishell, R.I.
Long-Term Effects of in Vitro Sensitization

- on Immune Reactivity of Lymphocytes:
Generation of Suppressor and Helper
T Cells. *J. Immunol.* 118,1391,1977
14. Chattopadhyay, C., Chattopadhyay, H.,
Natvig, J.B., Michaelsen, T.E. & Mellbye,
O.J. Lack of Suppressor Cell Activity in
Rheumatoid Synovial Lymphocytes. *Scand. J.*
Immunol. 10,309,1979
15. Dutton, R.W. Suppressor T Cells.
Transplant. Rev. 26,40,1975
16. Eardley, D.D. & Gershon, R.K. Induction
of Specific Suppressor T Cells in Vitro.
J. Immunol. 117,313,1976
17. Eardley, D.D., Hugenberg, J., McVay-
Boudreau, L., Shen, F.W., Gershon, R.K. &
Cantor, H. Immunoregulatory Circuits Among
T-Cell Sets. I. T-Helper Cells Induce
Other T-Cell Sets to Exert Feedback
Inhibition. *J. Exp. Med.* 147,1106,1978
18. Engleman, E.G., McMichael, A.J., Batey, M.E. &
McDevitt, H.O. A Suppressor T Cell of the
Mixed Lymphocyte Reaction in Man Specific
for the Stimulating Alloantigen. Evidence
that Identity at HLA-D between Suppressor
and Responder is Required for Suppression.
J. Exp. Med. 147,137,1978
19. Engleman, E.G., McMichael, A.J. & McDevitt,
H.O. Suppression of the Mixed Lymphocyte
Reaction in Man by a Soluble T-Cell Factor.
Specificity of the Factor for both Responder

- and Stimulator. J. Exp. Med. 147,1037,1978
20. Feighery, C., Whelan, C.A., Weir, D.G. & Greally, J.F. In vitro studies of suppressor cell function in human peripheral blood mononuclear cells. Clin. Exp. Immunol. 32, 459,1978
21. Feldmann, M. T Cell suppression in vitro. II. Nature of specific suppressive factor. Eur. J. Immunol. 4,667,1974
22. Fernandez, L.A. & Macsween, J.M. Generation of Suppressor Cells by Concanavalin A: A New Perspective. J. Immunol. 125,267,1980
23. Fineman, S.M., Mudawwar, F.B. & Geha, R.S. Characteristics and Mechanisms of Action of the Concanavalin A-Activated Suppressor Cell in Man. Cell. Immunol. 45,120,1979
24. Fleisher, T.A., Greene, W.C., Blaese, R.M. & Waldmann, T.A. Soluble Suppressor Supernatants Elaborated by Concanavalin A-Activated Human Mononuclear Cells. II. Characterization of a Soluble Suppressor of B Cell Immuno-globulin Production. J. Immunol. 126,1192,1981
25. Folch, H. & Waksman, B.H. The Splenic Suppressor Cell. II. Suppression of the Mixed Lymphocyte Reaction by Thymus-Dependent Adherent Cells. J. Immunol. 113, 140,1974
26. Frey, B.M., Frey, F.J., Cochrum, K.C. & Benet, L.Z. Induction Kinetics of Human

Suppressor Cells in the Mixed Lymphocyte Reaction and Influence of Prednisolone on Their Genesis. Cell. Immunol. 56,225,1980

27. Fuller, L., Kyriakides, G., Flaa, C., Esquenazi, V. & Miller, J. In vitro Generation of Human Mixed Lymphocyte Culture Suppressor Cells. I. Cellular Characterization and Specificity. Transplantation 29,54,1980
28. Galanaud, P., Crevon, M.C., Delfraissy, J.F., Segond, P., Wallon, C. & Dormont, J. Regulation of the primary in vitro antibody response in human peripheral blood lymphocytes: different effects of mitogen-induced and spontaneous T suppressor cells. Clin. Exp. Immunol. 38,106,1979
29. Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R. & Liebhaver, S.A. Suppressor T Cells. J. Immunol. 108,586,1972
30. Gershon, R.K. A Disquisition on Suppressor T Cells. Transplant. Rev. 26,170,1975
31. Götze, D. Gemischte Lymphozytenkultur, in: Bier, O.G., Götze, D., Mota, I. & Dias da Silva, W. Experimentelle und Klinische Immunologie, Berlin-Heidelberg-New York 1979, S. 221
32. Greene, W.C., Fleisher, T.A. & Waldmann, T.A. Soluble Suppressor Supernatants Elaborated by Concanavalin A-Activated Human Mononuclear Cells. I. Characterization of a Soluble

Suppressor of T Cell Proliferation.

J. Immunol. 126,1185,1981

33. Hallgren, H.M. & Yunis, E.J. Suppressor Lymphocytes in Young and Aged Humans. J. Immunol. 118,2004,1977
34. Haynes, B.F. & Fauci, A.S. Activation of Human B Lymphocytes. V. Kinetics and Mechanisms of Suppression of Plaque-Forming Cell Responses by Concanavalin A-Generated Suppressor Cells. J. Immunol. 120, 700,1978
35. Hirano, T. & Nordin, A.A. Cell-Mediated Immune Response in vitro. I. The development of Suppressor Cells and Cytotoxic Lymphocytes in Mixed Lymphocyte Cultures. J. Immunol. 116, 1115,1976
36. Hirschberg, H. & Thorsby, E. Activation of Human Suppressor Cells in Mixed Lymphocyte Cultures. Scand. J. Immunol. 6, 809,1977
37. Hodes, R.J. & Hathcock, K.S. In vitro Generation of Suppressor Cell Activity: Suppression of in vitro Induction of Cell-Mediated Cytotoxicity. J. Immunol. 116, 167,1976
38. Hubert, C., Delespesse, G. & Govaerts, A. Concanavalin A-activated suppressor cells in normal human peripheral blood lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 26,95,1976

39. Innes, J.B., Kuntz, M.M., Kim, Y.T. & Weksler, M.E. Induction of Suppressor Activity in the Autologous Mixed Lymphocyte Reaction and in Cultures with Concanavalin A. J. Clin. Invest. 64,1608,1979
40. Jacobson, E.B. In vitro studies of allotype suppression in mice. Eur. J. Immunol. 3, 619,1973
41. Jeffes III, E.W.B. & Granger, G.A. Relationship of Cloning Inhibition Factor, "Lymphotoxin" Factor, and Proliferation Inhibition Factor Release in vitro by Mitogen-Activated Human Lymphocytes. J. Immunol. 114,64,1975
42. Kadish, A.S., Tansey, F.A., Yu, G.S.M., Doyle, A.T. & Bloom, B.R. Interferon as a Mediator of Human Lymphocyte Suppression. J. Exp. Med. 151,637,1980
43. Kastner, D.L. & Rich, R.R. Regulation of Alloantigen-Induced Cytotoxic Responses by Concanavalin A-Activated Lymphoid Cells: Suppression by Antigen Elimination. J. Immunol. 121,1732,1978
44. Kaufman, D.B., Carnaud, C., Stach, J.-L. & Bach, J.-F. The Suppressive Effect of a Supernate from Concanavalin A-Activated Human Lymphocytes: Effects of Concanavalin A-Activated Lymphocytes and their Supernates on Cytotoxic and Mixed Lymphocyte Reactions. Cell. Immunol. 47,153,1979
45. Keystone, E.C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Clarke, D.A., Falk, J.A., Osoba, D. & Gordon, D.A.

Mixed Leukocyte Reaction in Rheumatoid
Arthritis. Arthr. and Rheum. 19,532,1976

46. Külsch, E., Stumpf, R. & Weber, G. Low
Zone Tolerance and Suppressor T Cells.
Transplant. Rev. 26,56,1975
47. Kuntz, M.M., Innes, J.B. & Weksler, M.E.
Lymphocyte Transformation Induced by
Autologous Cells. IV. Human T-Lymphocyte
Proliferation Induced by Autologous or
Allogeneic Non-T-Lymphocytes.
J. Exp. Med. 143,1042,1976
48. Leitner, O., Beck, A., Koch, B. & Kalden, J.R.
Impaired Autologous Mixed Lymphocyte
Reactivity in RA-Patients. Scand. J. Immunol.,
in press.
49. Manger, B., Kalden, J.R., Zawatzky, R. &
Kirchner, H. Interferon Production in
the Human Mixed Lymphocyte Culture.
Transplantation 32,149,1981
50. McCombs, C.C., Michalski, J.P. & Talal, N.
Acceleration of Human Lymphocyte Activation
after Preliminary Culture. J. Immunol. 120,
532,1978
51. McMichael, A.J. & Sasazuki, T. A Suppressor T
Cell in the Human Mixed Lymphocyte Reaction.
J. Exp. Med. 146,368,1977
52. Messner, R.P. Clinical Aspects of T- and
B-Lymphocytes in Rheumatic Diseases.
Arthr. and Rheum. 17,339,1974

53. Miller, R.A. & Kaplan, H.S. Generation of Cytotoxic Lymphocytes in the Autologous Mixed Lymphocyte Culture. J. Immunol. 121, 2165, 1978
54. Moretta, L., Mingari, M.C., Moretta, A. & Cooper, M.D. Human T Lymphocyte Subpopulations: Studies of the Mechanism by which T Cells Bearing Fc Receptors for IgG Suppress T-Dependent B Cell Differentiation Induced by Pokeweed Mitogen. J. Immunol. 122, 984, 1979
55. Morimoto, C., Reinherz, E.L., Abe, T., Homma, M. & Schlossman, S.F. Characteristics of Anti-T-Cell Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus: Evidence for Selective Reactivity with Normal Suppressor Cells Defined by Monoclonal Antibodies. Clin. Immunol. Immunopath. 16, 474, 1980
56. Nachtigal, D., Zan-Bar, I. & Feldman, M. The Role of Specific Suppressor T Cells in Immune Tolerance. Transplant. Rev. 26, 88, 1975
57. Namba, Y. & Waksman, B.H. Regulatory Substances Produced by Lymphocytes. III. Evidence That Lymphotoxin and Proliferation Inhibitory Factor are Identical and Different from the Inhibitor of DNA Synthesis. J. Immunol. 116, 1140, 1976
58. Namba, Y., Jegasothy, B.V. & Waksman, B.H. Regulatory Substances Produced by Lymphocytes. V. Production of Inhibitor of DNA Synthesis (IDS) by Proliferating T Lymphocytes.

J. Immunol. 118,1379,1977

59. Okumura, K. & Tada, T. Regulation of Homocytotropic Antibody Formation in the Rat. IX. Further Characterization of the Antigen-Specific Inhibitory T Cell Factor in Hapten-Specific Homocytotropic Antibody Response. J. Immunol. 112,783,1974
60. Opelz, G., Kiuchi, M. Takasugi, M. & Terasaki, P.I. Autologous Stimulation of Human Lymphocyte Subpopulations. J. Exp. Med. 142,1327,1975
61. Parish, C.R. Appearance of non-specific suppressor T cells during in vitro culture. Immunology 33,597,1977
62. Peavy, D.L. & Pierce, C.W. Cell Mediated Immune Responses in vitro. I. Suppression of the Generation of Cytotoxic Lymphocytes by Concanavalin A and Concanavalin A-Activated Spleen Cells. J. Exp. Med. 140, 356,1974
63. Randazzo, B., Pfeffer, P., Hirschberg, T. & Hirschberg, H. Opposing Effects of Methylprednisolone on in vitro Alloantigen-Induced Cytotoxic and Suppressor Lymphocytes in Man. J. Clin. Lab. Immunol. 4,175,1980
64. Reinherz, E.L. & Schlossman, S.F. CON A-Inducible Suppression of MLC: Evidence for Mediation by the TH2+ T Cell Subset in Man. J. Immunol. 122,1335,1979

65. Reinherz, E.L., Moretta, L., Roper, M., Breard, J.M., Mingari, M.C., Cooper, M.D. & Schlossman, S.F. Human T Lymphocyte Subpopulations Defined by Fc Receptors and Monoclonal Antibodies. A Comparison. J. Exp. Med. 151,969,1980
66. Reinherz, E.L. & Schlossman, S.F. The Differentiation and Function of Human T Lymphocytes. Cell. 19,821,1980
67. Rice, L., Laughter, A.H. & Twomey, J.J. Three Suppressor Systems in Human Blood that Modulate Lymphoproliferation. J. Immunol. 122,991,1979
68. Rich, R.R. & Pierce, C.W. Biological Expressions of Lymphocyte Activation. II. Generation of a Population of Thymus-Derived Suppressor Lymphocytes. J. Exp. Med. 137,649,1973
69. Rich, S.S. & Rich, R.R. Regulatory Mechanisms in Cell-Mediated Immune Responses. I. Regulation of Mixed Lymphocyte Reactions by Alloantigen-Activated Thymus-Derived Lymphocytes. J. Exp. Med. 140,1588,1974
70. Rich, R.R. & Pierce, C.W. Biological Expressions of Lymphocyte Activation. III. Suppression of Plaque-Forming Cell Responses in Vitro by Supernatant Fluids from Concanavalin A-Activated Spleen Cell Cultures. J. Immunol. 112,1360,1974
71. Rich, R.R. & Rich, S.S. Biological

Expressions of Lymphocyte Activation.
IV. Concanavalin A-activated Suppressor
Cells in Mouse Mixed Lymphocyte Reactions.
J. Immunol. 114,1112,1975

72. Rich, S.S. & Rich, R.R. Regulatory Mechanisms
in Cell-Mediated Immune Responses. II. A
Genetically Restricted Suppressor of
Mixed Lymphocyte Reactions Released by
Alloantigen-Activated Spleen Cells.
J. Exp. Med. 142,1391,1975
73. Rich, S.S. & Rich, R.R. Regulatory Mechanisms
in Cell-Mediated Immune Responses.
IV. Expression of a Receptor for Mixed
Lymphocyte Reaction Suppressor Factor on
Activated T Lymphocytes. J. Exp. Med. 144,
1214,1976
74. Rinehart, J.J. Induction of Nonspecific,
Proliferative Dependent, Suppressor
T Lymphocytes in Human Mixed Lymphocyte
Cultures. Cell. Immunol. 56,142,1980
75. Sakane, T. & Green, I. Human Suppressor
T Cells Induced by Concanavalin A:
Suppressor T Cells Belong to Distinctive
T Cell Subclasses. J. Immunol. 119,1169,1977
76. Sakane, T., Steinberg, A.D. & Green, I.
Studies of Immune Functions of Patients
with Systemic Lupus Erythematosus.
I. Dysfunction of Suppressor T-Cell
Activity Related to Impaired Generation of,
Rather than Response to, Suppressor Cells.
Arthr. and Rheum. 21,657,1978

77. Sakane, T., Steinberg, A.D. & Green, I.
Failure of autologous mixed lymphocyte
reaction between T and non-T cells in
patients with systemic lupus erythematosus.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75,3464,1978
78. Sakane, T. & Green, I. Specificity and
Suppressor Function of Human T Cells
Responsive to Autologous non-T Cells.
J. Immunol. 123,584,1979
79. Sampson, D., Grotelueschen, C. & Kauffman Jr.,
H.M. The Human Splenic Suppressor Cell.
Transplantation 20,362,1975
80. Scavulli, J. & Dutton, R.W. Competition
Between Concanavalin A-Induced Stimulatory
and Inhibitory Effects in the in vitro
Immune Response to Antigen. J. Exp. Med. 141,
524,1975
81. Sheehy, M.J., Mawas, C. & Charmot, D.
Specific Inhibition of Human Lymphocyte
Responses by Primed Autologous Lymphocytes.
I. Evaluation of MLR Inhibition as a
Model for Suppression. J. Immunol. 122,
2198,1979
82. Shou, L., Schwartz, S.A. & Good, R.A.
Suppressor Cell Activity after Concanavalin A
Treatment of Lymphocytes from Normal Donors.
J. Exp. Med. 143,1100,1976
83. Silverman, H.A., Johnson, J.S., Vaughan, J.H. &
McGlamory, J.C. Altered Lymphocyte Reactivity
in Rheumatoid Arthritis. Arthr. and Rheum. 19,509,1976

84. Smith, J.B. Stimulation of Autologous and Allogeneic Human T Cells by B Cells Occurs Through Separate B-Cell Antigen Systems. *Cell. Immunol.* 36,203,1978
85. Smith, J.B. & Knowlton, R.P. Activation of Suppressor T Cells in Human Autologous Mixed Lymphocyte Culture. *J. Immunol.* 123, 419,1979
86. Sondel, P.M., Jacobson, M.W. & Bach, F.H. Pre-Emption of Human Cell-Mediated Lympholysis by a Suppressive Mechanism Activated in Mixed Lymphocyte Cultures. *J. Exp. Med.* 142,1606,1975
87. Stites, D.P. Clinical Laboratory Methods of Detecting Cellular Immune Function. in: Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. & Wells, J.V. *Basic & Clinical Immunology*. Los Altos, Ca., 1980, S. 382
88. Tada, T., Taniguchi, M. & Takemori, T. Properties of Primed Suppressor T Cells and their Products. *Transplant. Rev.* 26,106,1975
89. Tada, T., Taniguchi, M. & David, C.S. Properties of the Antigen-Specific Suppressive T-Cell Factor in the Regulation of Antibody Response of the Mouse. IV. Special Subregion Assignment of the Gene(s) That Codes For the Suppressive T-Cell Factor in the H-2 Histocompatibility Complex. *J. Exp. Med.* 144,713,1976

90. Thomas, D.W., Roberts, W.K. & Talmage, D.W.
Regulation of the Immune Response:
Production of a Soluble Suppressor by
Immune Spleen Cells in vitro. J. Immunol. 114,
1616, 1975
91. Tibbetts, L.M., Glade, P.R. & Papageorgiu, P.S.
Presence of a Reversible Inhibitor for
Human Lymphoid Cell DNA Synthesis in the
Extracts of Human Peripheral Lymphocytes.
Cell. Immunol. 18, 384, 1975
92. Tse, H.Y. & Dutton, R.W. Separation of
Helper and Suppressor T Lymphocytes.
III. Positive and Negative Effects of
Mixed Lymphocyte Reaction-Activated
T Cells. J. Immunol. 120, 1149, 1978
93. Vande Stouwe, R.A., Kunkel, H.G., Halper,
J.P. & Weksler, M.E. Autologous Mixed
Lymphocyte Culture Reactions and Generation
of Cytotoxic T Cells. J. Exp. Med. 146,
1809, 1977
94. Waksman, B.H. & Namba, Y. Commentary:
On Soluble Mediators of Immunologic
Regulation. Cell. Immunol. 21, 161, 1976
95. Waksman, B.H. & Tada, T. Specific and
Nonspecific Suppressor T-Cell Factors
Derived from Thymic Lymphocytes.
Cell. Immunol. 30, 189, 1977
96. Wasserman, J., von Stedingk, L.-V.,
Biberfeld, G., Petrini, B., Blomgren, H. &
Baral, E. The effect of irradiation on

- T-cell suppression of ELISA-determined
Ig production by human blood B-cells
in vitro. Clin. Exp. Immunol. 38,366,1979
97. Weigle, W.O., Sieckmann, D.G., Doyle, M.V. &
Chiller, J.M. Possible Roles of Suppressor
Cells in Immunological Tolerance.
Transplant. Rev. 26,186,1975
98. Weksler, M.E. & Kozak, R. Lymphocyte
Transformation Induced by Autologous Cells.
V. Generation of Immunologic Memory and
Specificity during the Autologous Mixed
Lymphocyte Reaction. J. Exp. Med. 146,
1833,1977
99. Williams Jr., R.C. & Korsmeyer, S.J.
Studies of Human Lymphocyte Interactions
with Emphasis on Soluble Suppressor Activity.
Clin. Immunol. Immunopath. 9,335,1978
100. Wolf, R.L., Whitshed, H., Rosen, F.S. &
Merler, E. A Soluble Inhibitor of B and
T Cell Proliferation and Antibody Synthesis
Produced by Dividing Human T Cells.
Cell. Immunol. 36,231,1978
101. Yu, D.T.Y., Chiorazzi, N. & Kunkel, H.G.
Helper Factors Derived from Autologous
Mixed Lymphocyte Cultures. Cell. Immunol. 50,305,1980
102. Zembala, M. & Asherson, G.L. T cell suppression
of contact sensitivity in the mouse.
II. The role of soluble suppressor factor
and its interaction with macrophages.
Eur. J. Immunol. 4,799,1974

103. Zier, K.S., Huber, C. & Braunsteiner, H.
Restimulation in Secondary MLC by Autologous
Non-T Cells. Scand. J. Immunol. 9,493,1979

D A N K S A G U N G

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.R. Kalden
für die Betreuung der Arbeit sowie allen
Blutspendern und den Mitarbeitern des
Institutes für die gute Zusammenarbeit,
insbesondere Anna Beck, Claudia Stasing
und Dr. B. Koch.

LEBENS LAUF

Am 1. Juli 1957 wurde ich als erstes Kind des Offiziers der Bundeswehr Karl Glückel und seiner Ehefrau Arita, geb. Stelter, in Bad Mergentheim geboren. Ich habe eine jüngere Schwester. Die Volksschule besuchte ich in Regensburg, Donau und nach Umzug meiner Eltern in Rendsburg, Holstein. Dort wechselte ich 1966 auf das Gymnasium über (math.-naturwiss. Zweig). Zwei Jahre später folgte ein erneuter Umzug zurück nach Regensburg. Am dortigen Goethe-Gymnasium legte ich 1975 das Abitur ab. Von Juli 1975 bis September 1976 leistete ich Grundwehrdienst beim Flugabwehrbataillon 4 in Regensburg. Zum Wintersemester 1976/77 nahm ich an der Universität Regensburg das Studium der Humanmedizin auf. Nach Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung im Sommersemester 1978 wechselte ich an die Universität Erlangen, wo ich am 5. Oktober 1982 die Ärztliche Prüfung erfolgreich ablegte.

